

L-Cystein-Bildung mit *Corynebacterium glutamicum* und optische Sensoren zur zellulären Metabolitanalyse

Kristina Hoffmann

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Bio-und Geowissenschaften (IBG)
Biotechnologie (IBG-1)

L-Cystein-Bildung mit *Corynebacterium glutamicum* und optische Sensoren zur zellulären Metabolitanalyse

Kristina Hoffmann

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health

Band / Volume 69

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-939-3

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten
sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Herausgeber
und Vertrieb: Forschungszentrum Jülich GmbH
Zentralbibliothek, Verlag
52425 Jülich
Tel.: +49 2461 61-5368
Fax: +49 2461 61-6103
E-Mail: zb-publikation@fz-juelich.de
www.fz-juelich.de/zb

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2014

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health, Band / Volume 69

D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2013)

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-939-3

Vollständig frei verfügbar im Internet auf dem Jülicher Open Access Server (JUWEL)
unter www.fz-juelich.de/zb/juwel

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Druck, Fotokopie oder
in einem anderen Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder
unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

“The only real voyage of discovery consists not in seeking new landscapes but in having new eyes.”

- *Marcel Proust* -

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis	v
Zusammenfassung.....	1
Abstract	3
1 Einleitung.....	5
1.1 <i>Corynebacterium glutamicum</i> und seine Bedeutung als Produzent	5
1.2 L-Cystein	6
1.2.1 Biosynthese von L-Cystein in <i>C. glutamicum</i>	6
1.2.2 Assimilatorische Reduktion von Schwefel	8
1.2.3 Transkriptionsregulation des Schwefel-Metabolismus	10
1.2.4 Industrielle Bedeutung und Herstellung von L-Cystein	11
1.3 Metabolitsensoren	12
1.4 Ziele der Arbeit.....	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Chemikalien und Enzyme	15
2.2 Bakterienstämme und Plasmide	15
2.3 Oligonukleotide	17
2.4 Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung von Bakterien	21
2.4.1 Nährmedien	21
2.4.2 Kultivierung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	22
2.4.3 Kultivierung von <i>C. glutamicum</i> -Stämmen.....	22
2.4.4 Kultivierung von <i>C. glutamicum</i> im BioLector	22
2.4.5 Stammhaltung von Bakterien.....	23
2.4.6 Bestimmung des Wachstums von Bakterienkulturen	23
2.5 Molekularbiologische Methoden	23
2.5.1 Isolierung von DNA	23
2.5.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	24
2.5.3 Rekombinante DNA-Techniken	24
2.5.4 Transformationstechniken	24
2.5.5 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion	25
2.5.6 Konstruktion von Deletionsmutanten	26
2.5.7 DNA-Sequenzanalyse.....	27

2.6	Quantitative Bestimmung von Aminosäuren	27
2.6.1	Konzentrationsbestimmung von Aminosäuren mittels HPLC-MS.....	27
2.6.2	Bestimmung intrazellulärer Aminosäurekonzentrationen.....	28
2.7	Biochemische Methoden	29
2.7.1	Zellaufschluss mit Ultraschall	29
2.7.2	Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Agarose	29
2.7.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	29
2.7.4	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	30
2.7.5	MALDI-TOF Massenspektrometrie	30
2.8	Spektroskopische Analysen.....	30
2.8.1	Epifluoreszenzmessung	30
2.8.2	Fluoreszenzmessungen	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Konstruktion eines plasmidfreien L-Serin-Produktionsstammes	32
3.1.1	Chromosomale Integration des Gens für die feedbackresistente 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase	32
3.1.2	Promotoraustausch der C-terminal verkürzten 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase im Chromosom durch einen starken konstitutiven Promotor.....	34
3.2	Steigerung der L-Cystein-Bildung mit <i>C. glutamicum</i>	36
3.2.1	Wachstum in Anwesenheit von L-Cystein	36
3.2.2	Expression rekombinanter Serin-Acetyltransferasen	37
3.2.3	Expression von <i>cysE</i> und <i>cysK</i>	39
3.2.4	Deletion von <i>aecD</i>	40
3.2.5	Deletion von <i>metX</i>	41
3.2.6	Schwefel-Verfügbarkeit	43
3.3	Entwicklung eines Biosensors zur intrazellulären Detektion der Metabolite <i>O</i> -Acetyl-L-Serin und <i>O</i> -Acetyl-L-Homoserin in <i>C. glutamicum</i>	44
3.3.1	Konstruktion der Biosensor-Varianten.....	44
3.3.2	Untersuchungen zur OAS-abhängigen Fluoreszenz	45
3.3.3	Untersuchungen zur OAH-abhängigen Fluoreszenz.....	49
3.3.4	Fluoreszenz der Biosensoren unter Schwefel-Mangel.....	52
3.4	Untersuchungen zum Einfluss des Regulators CysR auf die L-Cystein-Bildung	53
3.4.1	Expression von <i>cysR</i> unter Kontrolle von P_{tac}	54
3.4.2	Expression von <i>cysR</i> unter Kontrolle des nativen Promotors	54

3.5	Sulfid-Sensor <i>E. coli</i>	56
4	Diskussion	59
4.1	Konstruktion eines plasmidfreien L-Serin-Produktionsstamms	59
4.2	L-Cystein-Bildung mit <i>C. glutamicum</i>	60
4.3	Entwicklung von Biosensoren zur intrazellulären Detektion der Metabolite <i>O</i> -Acetyl-L-Serin und <i>O</i> -Acetyl-L-Homoserin in <i>C. glutamicum</i>	64
4.4	Untersuchungen zum Einfluss des Regulators CysR auf die L-Cystein-Produktion	66
4.5	Sulfid-Sensor <i>E. coli</i>	68
4.6	Ausblick	68
	Literaturverzeichnis	70
	Danksagung	81

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
Ω	Ohm
μ	mikro (10^{-6})
A	Adenin
A	Ampere
Amp	Ampicillin
APS	Adenosinphosphosulfat
APS	Ammoniumpersulfat
ATC	Anhydrotetrazyclin
BHI	<i>brain heart infusion</i>
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cpGFP	<i>circularly permuted green fluorescent protein</i>
Cm	Chloramphenicol
CS	Cystein-Synthase
D	Asparaginsäure
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	<i>et alii</i> (lat. „und andere“)
F	<i>Farad</i>
f	femto (10^{-15})
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
fbr	feedbackresistent
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
G	Guanin
h	<i>hour</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IPTG	Isopropylthiogalctosid
k	Kilo
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
m	milli (10^{-3})
m	Meter
M	Molar
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	Minute
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie

n	nano (10^{-9})
NAS	<i>N</i> -Acetyl-L-Serin
OAS	<i>O</i> -Acetyl-L-Serin
OAH	<i>O</i> -Acetyl-L-Homoserin
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
P	Prolin
PAPS	Phosphoadenosinphosphosulfat
pAzF	<i>p</i> -Azidophenylalanin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	Konzentration des Wasserstoffs
PLP	Pyridoxal-5'-Phosphat
psig	<i>pound-force per square inch gauge</i>
R	Arginin
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAH	<i>S</i> -Adenosyl-L-Homocystein
SAM	<i>S</i> -Adenosyl-L-Methionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOB	<i>super optimal broth</i>
Spec	Spectinomycin
T	Thymin
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetrazyclin
THF	Tetrahydrofolat
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transport-RNA
w/v	<i>weight per volume</i>
WT	Wildtyp
U	<i>unit</i>
U	Uracil
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Valin
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
YT	<i>yeast extract and tryptone</i>

Zusammenfassung

L-Cystein ist eine wichtige Aminosäure, da sie reduzierten Schwefel für die Synthese zahlreicher zelleigener Verbindungen bereitstellt, so einschließlich der Synthese von L-Methionin. Neben der Bedeutung von L-Cystein für die Zellsynthese spielt diese Aminosäure auch wirtschaftlich eine zunehmende Rolle. Sie findet Anwendung in der Lebensmittel-, Pharma- und Kosmetikindustrie, sodass es einen Bedarf für die fermentative Herstellung von L-Cystein gibt. Ziel dieser Arbeit war die Konstruktion eines L-Cystein-Produktionsstammes basierend auf einem sehr effizienten L-Serin-Produktionsstamm von *Corynebacterium glutamicum*. Außerdem wurden Metabolitsensoren zur Untersuchung der intrazellulären Schwefel-Verfügbarkeit entwickelt. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- (1) Der *C. glutamicum* L-Serin-Produzent Ser4 trägt das Plasmid *pserACB*. Um die genetischen Arbeiten mit diesem Stamm für die L-Cystein-Bildung zu vereinfachen, sollte die plasmidfreie Überproduktion von L-Serin ermöglicht werden. Die chromosomale Integration des Gens *serA^{fbr}* für die feedbackresistente 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase führte zu geringer Akkumulation von L-Serin im Medium. Analysen zum Austausch des Promotors vor *serA^{fbr}* in Kombination mit plasmidbasierter Expression von *serC* und *serB* ergaben, dass neben der starken Expression von *serA^{fbr}* noch zusätzlich die erhöhte Expression von *serC* und *serB* notwendig ist, um hohe L-Serin-Mengen produzieren zu können.
- (2) Im Gegensatz zu Genen für heterologe feedbackresistente Serin-Acetyltransferasen führte die Expression von *cysE* aus *C. glutamicum* im L-Serin-Produzenten Ser4 trotz Feedback-Inhibierung des Enzyms bereits zu einer Verbesserung der L-Cystein-Bildung von $0,95 \pm 0,35$ mM auf $5,6 \pm 0,8$ mM. In Kombination mit der Expression von *cysK*, welches für die O-Acetylserin-Sulfhydrylase kodiert, konnten $7,3 \pm 0,7$ mM L-Cystein gebildet werden. Die Deletion der Cystein-Desulfurase AecD zur Verhinderung des L-Cystein-Abbaus, das Ausschalten der L-Methionin-Synthese durch Deletion des *metX*-Gens für die Homoserin-Acetyltransferase sowie die verstärkte Expression des Operons *fpr2-cysIXHDNYZ* für die assimilatorische Sulfat-Reduktion führten dahingegen nur zu mäßiger Verbesserung der L-Cystein-Bildung.
- (3) Zur Konstruktion von Metabolitsensoren zur Detektion der Schwefel-Akzeptor-Moleküle O-Acetyl-L-Serin (OAS) und O-Acetyl-L-Homoserin (OAH) wurden die Promotorbereiche der Gene NCgl1289 und *cysI* inklusive CysR-Bindestelle an das Reportergen *eyfp* fusioniert. Die so entstandenen Sensorkassetten enthielten zusätzlich das Gen des Transkriptionsregulators CysR, welcher die Gene für die assimilatorische Sulfat-Reduktion aktiviert. Intrazellulär erhöhte Konzentrationen von OAS und OAH gingen mit einer Erhöhung der spezifischen Fluoreszenz einher. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Sensoren bei limitierender Sulfat-Verfügbarkeit zu fluoreszierenden Zellen führten.
- (4) Um den Einfluss des Transkriptionsregulators CysR auf die L-Cystein-Bildung zu untersuchen, wurde das Gen *cysR* unter Kontrolle des nativen Promotors und P_{tac} exprimiert. Die Ergebnisse zeigten, dass eine erhöhte Expression von CysR nicht zwangsläufig auch zu einer erhöhten L-Cystein-Bildung führt, sondern die Feinabstimmung des Regulators als Teil des Regulationsnetzwerks des Schwefel-

Stoffwechsels, zusammen mit den Transkriptionsregulatoren McbR und SsuR, eine große Rolle spielt.

Zusammengefasst ist es in dieser Arbeit gelungen, die L-Cystein-Produktion in *C. glutamicum* auf $7,3 \pm 0,7$ mM zu verbessern. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass sich die Verbesserung der L-Cystein-Produktion aufgrund der komplexen Regulation des Schwefel-Stoffwechsels als schwierig erwies. Die Metabolitsensoren für *O*-Acetyl-L-Serin und *O*-Acetyl-L-Homoserin ermöglichen *in vivo*-Analysen auf Einzelzellebene zu den intrazellulären Konzentrationen der beiden Metabolite. Sie stellen somit ein wichtiges Hilfsmittel für die Analyse des zellulären Schwefelstoffwechsels dar.

Abstract

L-Cysteine is an important amino acid and is in addition to L-methionine the most abundant sulfur containing molecule inside the cell. It provides reduced sulfur for the synthesis of a variety of other sulfur containing compounds. Besides its importance for microbial growth there is also a growing interest for L-cysteine in the food, pharmaceutical and cosmetics industries and therefore a need for the production of L-cysteine by fermentation exists. Consequently, the main objective of this study was to construct a L-cysteine producer based on an efficient *Corynebacterium glutamicum* L-serine producing strain. Furthermore the development of metabolite sensors for intracellular detection of sulfur availability should be achieved. The following results were obtained:

- (1) The L-serine producer Ser4 contains the plasmid *pserACB*. To facilitate further genetic work concerning L-cysteine formation with this strain, the production of L-serine without a plasmid was desirable. The chromosomal integration of the gene *serA^{fbr}*, coding for a feedback-resistant 3-phosphoglycerate dehydrogenase, led already to slight L-serine formation. Studies on a promoter exchange of *serA^{fbr}* in combination with plasmid based expression of the genes *serC* and *serB* revealed that strong expression of *serA^{fbr}* together with that of *serC* and *serB* is necessary to obtain high L-serine production.
- (2) In contrast to the expression of genes encoding heterologous feedback-resistant serine acetyltransferases the increased expression of native *cysE* from *C. glutamicum* led to improvement of L-cysteine formation from 0.95 ± 0.35 mM to 5.6 ± 0.8 mM in the L-serine producer. In combination with expression of *cysK*, coding for the *O*-acetylserine sulphydrylase, 7.3 ± 0.7 mM L-cysteine accumulated in the culture supernatant. The deletion of genes encoding cysteine desulfurase AecD to prevent L-cysteine degradation and homoserine acyltransferase MetX to disable L-methionine synthesis as well as the expression of the operon *fpr2-cysIXHDNYZ* necessary for assimilatory sulfate reduction had a moderate effect on L-cysteine formation.
- (3) To construct metabolite sensors for the detection of the sulfur acceptor molecules *O*-acetyl-L-serine (OAS) and *O*-acetyl-L-homoserine (OAH) promoter regions of genes NCgl1289 and *cysI* including CysR-binding sites were fused to the reporter gene *eyfp*. Additionally, the respective sensor cassettes contained the gene of transcriptional regulator CysR, which activates the genes for the assimilatory sulfate reduction. It could be shown that intracellular elevated levels of OAS and OAH led to increased specific fluorescence at the single cell level and that cultures cultivated under limiting sulfur conditions showed increased fluorescence.
- (4) To analyze the impact of the transcriptional regulator CysR on L-cysteine formation the gene *cysR* was expressed under control of the native promoter as well as P_{tac} . It could be shown, that increased expression of CysR does not necessarily improve the L-cysteine formation. The results indicate the delicate regulation of sulfur metabolism in *C. glutamicum*, in which the three transcriptional regulators CysR, McbR and SsuR are involved.

In summary, L-cysteine formation with *C. glutamicum* could be improved up to 7.3 ± 0.7 mM, but due to the complex regulation of sulfur metabolism it proved to be difficult to achieve high production. Furthermore, the metabolite sensors for *O*-acetyl-L-serine and *O*-acetyl-L-

homoserine facilitate *in vivo* studies at the single-cell level to detect intracellular levels of the respective metabolites. Therefore, they represent an important tool for the analysis of cellular sulfur metabolism.

1 Einleitung

1.1 *Corynebacterium glutamicum* und seine Bedeutung als Produzent

Corynebacterium glutamicum wurde erstmals 1957 von Udaka und Kinoshita beschrieben und bei der Suche nach einem L-Glutamat-Produzenten isoliert (Kinoshita *et al.*, 1957). Zunächst *Micrococcus glutamicus* genannt, wurde der Organismus später aufgrund von taxonomischen Studien der Gattung *Corynebacterium* zugeordnet und in *Corynebacterium glutamicum* umbenannt. Innerhalb der Ordnung Actinomycetales gehört die Gattung *Corynebacterium* der Unterordnung der *Corynebacterineae* sowie der Familie der *Corynebacteriaceae* an (Stackebrandt *et al.*, 1997). Bei *C. glutamicum* handelt es sich um ein Gram-positives Bodenbakterium, welches unbeweglich ist, schnelles Wachstum aufweist sowie Biotin-auxotroph ist (Abe *et al.*, 1967; Gao & Gupta, 2012; Pascual *et al.*, 1995). Eine Besonderheit der *Corynebacterianeae* ist deren Zellwandaufbau. Obwohl *C. glutamicum* zu den Gram-positiven Eubakterien gehört, besitzt das Bakterium eine äußere Membran, die aus Mycolsäuren besteht und sowohl in dieser als auch in verwandten Familien der *Mycobacteriaceae* und *Nocardiaceae* vorkommt (Zuber *et al.*, 2008). Weiterhin finden sich in der Zellwand Arabinogalaktan und auf Mannose aufbauende Glykolipide (Alderwick *et al.*, 2007). Da neben vielen nicht-pathogenen Arten wie *C. glutamicum* auch einige pathogene Arten wie z. B. *Mycobacterium tuberculosis* dieser Unterordnung angehören, ist die Zellwand ein Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Antibiotika. Aufgrund der einfachen Kultivierbarkeit dient *C. glutamicum* als Modellorganismus für die biochemische Charakterisierung der Zellwandsynthese (Bhowruth *et al.*, 2008).

C. glutamicum stellt einen der bedeutendsten Mikroorganismen der weißen Biotechnologie dar (Eggeling & Sahm, 1999), mit dem im industriellen Maßstab Aminosäuren hergestellt werden. Der größte Anteil entfällt dabei mit einer Jahresproduktion von 2,5 Millionen Tonnen auf den Geschmacksverstärker L-Glutamat (Vertès *et al.*, 2013). Darauf folgt die Aminosäure L-Lysin mit einer jährlichen Produktion von 1,8 Millionen Tonnen. Diese Aminosäure findet als Futterzusatz in der Massentierhaltung Anwendung (Vertès *et al.*, 2013). Weiterhin werden verschiedene Aminosäuren in hoher Qualität mit einer Jahresproduktion von etwa 25000 Tonnen hergestellt, die hauptsächlich für pharmazeutische Applikationen eingesetzt werden (Vertès *et al.*, 2013). Neben der klassischen Aminosäureproduktion gibt es viele Anstrengungen das Produktspektrum von *C. glutamicum* zu erweitern und es wurden bereits Prozesse zur Bildung von Succinat (Litsanov *et al.*, 2012), Lactat (Okino *et al.*, 2008), Cadaverin (Kind *et al.*, 2010), Putrescin (Schneider & Wendisch, 2010) und Isobutanol (Smith *et al.*, 2010) entwickelt.

Während früher Produktionsstämme durch mehrere Runden zufälliger Mutagenese und Selektion hergestellt und verbessert wurden, hat die Entwicklung auf dem Gebiet der rekombinanten DNA-Techniken zusätzlich rationale Ansätze ermöglicht (Becker & Wittmann, 2012b). Die Sequenzierung des Genoms von *C. glutamicum* im Jahr 2003 (Ikeda & Nakagawa, 2003; Kalinowski *et al.*, 2003; Tauch *et al.*, 2002a) sowie die zunehmenden

Kenntnisse der Stoffwechselwege und -flüsse sind in Kombination mit Methoden wie gradueller Genexpression und Gendeletion (Eikmanns *et al.*, 1991; Schäfer *et al.*, 1990; Schäfer *et al.*, 1994) für die Entwicklung neuer Produktionsstämme wegweisend. Dennoch ist die Gewinnung von Produktionsstämmen mithilfe von klassischer Mutagenese nach wie vor von großem Interesse. Sie dienen dazu, spezifische Mutationen bereitzustellen, die in rekombinanten Ansätzen genutzt werden können (Becker & Wittmann, 2012a). Ferner haben solche Stämme in einigen Fällen hervorragende Produktionseigenschaften, die möglicherweise auf die Kombination spezieller Mutationen zurückzuführen sind, deren Bedeutung im Einzelnen noch nicht verstanden ist (Ikeda *et al.*, 2011). Somit gibt es in jüngster Zeit Bestrebungen, mithilfe von Hochdurchsatz-Screenings eine effizientere Nutzung der klassischen Mutagenese durchzuführen und sich dabei optische Metabolitsensoren zunutze zu machen (Binder *et al.*, 2012; Mustafi *et al.*, 2012). Die Vielfalt der bisher vorhandenen Methoden und Ansätze ist nicht nur im Hinblick auf die Optimierung vorhandener Produktionsstämme interessant, sondern ebnet auch den Weg, das Produktspektrum von *C. glutamicum* zu erweitern.

1.2 L-Cystein

Schwefel ist ein essentielles Spurenelement für mikrobielles Wachstum, da es Bestandteil zahlreicher zelleigener Verbindungen wie z. B. L-Cystein, L-Methionin, Thiamin, Coenzym A, Liponsäure, Mycothiol, Biotin und von Eisen-Schwefel-Clustern ist. Dabei sind L-Cystein und L-Methionin die vorherrschenden schwefelhaltigen Moleküle in der Zelle. Üblicherweise sind die Quellen für Schwefel oxidierte Verbindungen, wie z. B. Sulfat, die von den Mikroorganismen zunächst zu Sulfid reduziert werden müssen, bevor sie in organische Moleküle eingebaut werden können.

1.2.1 Biosynthese von L-Cystein in *C. glutamicum*

Die Synthese von L-Cystein ist für *C. glutamicum* der Hauptweg, über den die Zelle reduzierten Schwefel in zelluläre Verbindungen einbringen kann. L-Cystein wird hauptsächlich für die Proteinbiosynthese benötigt, ist aber auch Ausgangspunkt für andere schwefelhaltige Verbindungen der Zelle. Die Synthese von L-Cystein scheint in vielen Organismen ähnlich abzulaufen (Kredich, 1996; Umbarger, 1978) und findet in zwei enzymatischen Schritten ausgehend von L-Serin statt (s. Abb. 1.1). Beim ersten Schritt wird L-Serin durch die Serin-Acetyltransferase (SAT, *cysE*) acetyliert und O-Acetyl-L-Serin (OAS) entsteht (Wada *et al.*, 2002). Der zweite Schritt wird von der O-Acetylserin-Sulphydrylase (OASS, *cysK*) katalysiert (Wada *et al.*, 2004). OASS aus *C. glutamicum* enthält eine Pyridoxalphosphat (PLP)-bindende Domäne und ist vermutlich wie das homologe Enzym aus *Escherichia coli* PLP-abhängig (Lee, 2005). Im Gegensatz zu *E. coli*, welches zwei Isoformen besitzt (OASS-A, *cysK* und OASS-B, *cysM*), scheint es in *C. glutamicum* nur eine aktive Isoform zu geben, da die Deletion von *cysK* zur L-Cystein-Auxotrophie führt (Rückert & Kalinowski, 2008). OASS-B aus *E. coli* kann im Gegensatz zu OASS-A auch Thiosulfat als Schwefelquelle verwenden, wobei S-Sulfocystein entsteht (Kredich, 1996). S-Sulfocystein wird anschließend von den Glutaredoxinen NrdH und Grx1 zu L-Cystein reduziert (Nakatani *et al.*, 2012). Der physiologische Vorteil dieser Reaktion für die Zelle ist die Umgehung der energieaufwendigen Sulfat-Reduktion. Für *C. glutamicum* konnte gezeigt werden, dass ein Wachstum mit Thiosulfat als Schwefelquelle möglich ist, der genaue Mechanismus ist

jedoch nicht bekannt. Allerdings ist für das Wachstum mit Thiosulfat wenigstens die Sulfite-Reduktase CysI notwendig (Rückert *et al.*, 2005). Die Synthese von L-Cystein unterliegt einer Feedback-Regulation, da SAT aus *C. glutamicum* wie das homologe Enzym aus *E. coli* durch L-Cystein feedbackinhibiert ist (Haitani *et al.*, 2006; Kredich, 1996). Interessanterweise gibt es in Pflanzen einige SATs, die keiner Feedback-Regulation unterliegen (Wirtz & Hell, 2006). In *Arabidopsis thaliana* z. B. ist die cytosolische SAT-Isoform stark feedbackinhibiert, wohingegen die Isoformen aus Mitochondrien und Chloroplasten weniger stark bzw. gar nicht durch L-Cystein gehemmt sind (Noji *et al.*, 1998; Wirtz & Hell, 2003).

Sowohl in *E. coli* als auch in Pflanzen bilden SAT und OASS zusammen einen Proteinkomplex, den sogenannten Cystein-Synthase-Komplex (CS-Komplex; Kredich, 1996; Wirtz and Hell, 2006). Dabei dient die Bildung des CS-Komplexes jedoch nicht zur Kanalisierung der Metabolite, sondern der Komplex nimmt Einfluss auf die Aktivität beider Proteine. SAT zeigt die Hauptaktivität im CS-Komplex, wohingegen OASS im CS-Komplex inaktiv ist. Durch einen molaren Überschuss an OASS ist jedoch nur eine kleine Fraktion des Enzyms im CS-Komplex gebunden und der Großteil liegt als freies, aktives Protein vor. Zusätzlich wurde gezeigt, dass *in vitro* der CS-Komplex in Anwesenheit von OAS dissoziiert, während Sulfid den Proteinkomplex stabilisiert (Kredich *et al.*, 1969; Wirtz *et al.*, 2004; Wirtz & Hell, 2006). Für Pflanzen wurde postuliert, dass der CS-Komplex eine wichtige Funktion bei der Regulation der Schwefel-Homöostase einnimmt (Hell & Wirtz, 2011). Wenn nicht genügend Sulfid vorhanden ist, akkumuliert OAS, der CS-Komplex dissoziiert und SAT wird inaktiv. Dabei beeinflusst OAS direkt oder indirekt die Transkription der Gene für die Aufnahme und Reduktion von Schwefel (Hell & Wirtz, 2011). In *E. coli* übernimmt diese Rolle der Transkriptionsregulator CysB, der in Anwesenheit des OAS-Derivats und Effektors *N*-Acetyl-L-Serin (NAS) die Gene der assimilatorischen Sulfat-Reduktion aktiviert (Kredich, 1996). Die Regulation dieser Gene funktioniert in *C. glutamicum* nach einem ähnlichen Prinzip und ist in Abschnitt 1.2.3 beschrieben. Ob es in *C. glutamicum* auch zur Ausbildung eines CS-Komplexes kommt, ist bisher noch nicht untersucht.

Der Abbau von L-Cystein wird durch Cystein-Desulfurasen vermittelt. Für *C. glutamicum* sind aufgrund von Sequenzvergleichen und Funktionsanalysen mehrere solcher Enzyme bekannt, die wahrscheinlich an der Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern beteiligt sind (Marienhagen *et al.*, 2005; McHardy *et al.*, 2003). Weiterhin besitzt das Enzym Cystathionin β -Lyase (AecD) Cystein-Desulfurase-Aktivität und baut L-Cystein zu Sulfid, Ammonium und Pyruvat ab (Rossol & Pühler, 1992). Obwohl diese Reaktion vermutlich nur eine Nebenreaktion des Enzyms und nicht dessen physiologische Rolle ist, konnte durch Deletion von *aecD* bereits ein positiver Effekt auf die L-Cystein-Bildung in *C. glutamicum* gezeigt werden (Wada *et al.*, 2002). Die eigentliche Funktion der Cystathionin β -Lyase ist die Umsetzung von L-Cystathionin zu L-Homocystein bei der Transsulfurierung im L-Methionin-Stoffwechsel (Kim *et al.*, 2001). L-Methionin wird ausgehend von L-Homoserin gebildet (s. Abb. 1.1). Dieses wird durch die Homoserin-Acetyltransferase MetX aktiviert (Park *et al.*, 1998). Das entstandene *O*-Acetyl-L-Homoserin (OAH) kann entweder mittels direkter Sulfhydrylierung durch die *O*-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase MetY in L-Homocystein umgewandelt werden (Hwang *et al.*, 2002) oder über die Transsulfurierung.

Bei der Transsulfurierung entsteht zunächst mithilfe der Cystathionin γ -Synthase MetB aus OAH und L-Cystein L-Cystathionin (Hwang *et al.*, 1999), bevor AecD L-Cystathionin zu L-Homocystein, Pyruvat und Ammonium umsetzt. Der letzte Schritt der L-Methionin-Synthese, die Methylierung von L-Homocystein zu L-Methionin, wird von der Methionin-Synthase katalysiert. In *C. glutamicum* gibt es zwei Methionin-Synthasen, MetE und das Vitamin B₁₂-abhängige MetH-Enzym (Rückert *et al.*, 2008). Die Methylgruppe, die für diese Reaktion benötigt wird, wird mithilfe der Serin-Hydroxymethyltransferase GlyA von L-Serin auf Tetrahydrofolat (THF) übertragen. In dieser Reaktion wird L-Glycin frei. Anschließend wird das entstandene N^{5,10}-Methylen-THF von der Methylen-THF-Reduktase MetF reduziert und die Methylgruppe für MetE bzw. MetH bereitgestellt. L-Methionin wird neben dem Bedarf für die Proteinbiosynthese als zentraler Donor für Methylgruppen benötigt, z. B. für die Methylierung von DNA (Schäfer *et al.*, 1997).

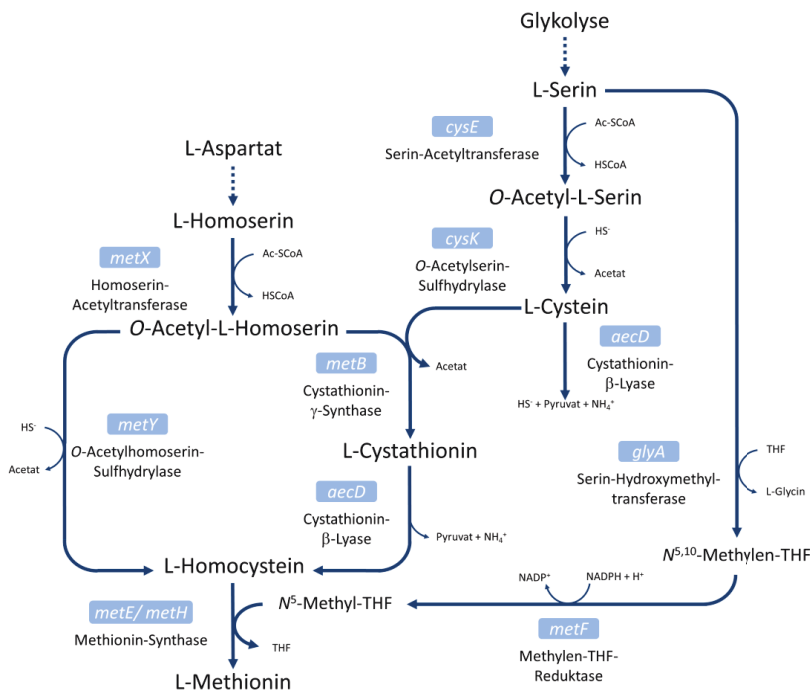


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der L-Cystein- und L-Methionin-Synthese in *C. glutamicum*.

1.2.2 Assimilatorische Reduktion von Schwefel

Damit Schwefel dem Stoffwechsel zur Verfügung stehen kann, muss dieser zunächst zu Sulfid reduziert werden. In *E. coli* wurde die assimilatorische Reduktion von Sulfat bereits ausführlich untersucht (Kredich, 1996). Aufgrund von Sequenzvergleichen und genetischen Arbeiten wurde in *C. glutamicum* der Gencluster *fpr2-cysIXHDNYZ* identifiziert, der fast alle Gene für die assimilatorische Sulfat-Reduktion trägt (Rückert *et al.*, 2005).

Die Aufnahme von Sulfat und Sulfit wird sehr wahrscheinlich durch das Membranprotein CysZ vermittelt (s. Abb. 1.2). Die Reduktion von Sulfat zu Sulfit findet vermutlich in zwei

Schritten statt. Zunächst wird Sulfat durch die ATP-Sulfurylase CysDN aktiviert und Adenosinphosphosulfat (APS) entsteht. In *E. coli* muss APS durch die APS-Kinase CysC zu Phosphoadenosinphosphosulfat (PAPS) phosphoryliert werden, bevor Sulfit durch die PAPS-Reduktase CysH freigesetzt werden kann (Kredich, 1996). In *C. glutamicum* ist jedoch kein für CysC kodierendes Gen vorhanden, sodass CysH vermutlich APS direkt als Substrat verwendet. Diese Vermutung basiert sowohl auf dem Vorhandensein von Sequenzmotiven, die für APS-Reduktasen spezifisch sind (Kopriva *et al.*, 2002), als auch auf der Ähnlichkeit zur APS-Reduktase aus *M. tuberculosis* (Williams *et al.*, 2002). Die Reduktion von Sulfit zu Sulfid in *C. glutamicum* ähnelt wahrscheinlich eher der in Pflanzen als der in *E. coli*. Das putative Hämoprotein CysI zeigt eine höhere Sequenz-Ähnlichkeit zu Ferredoxin-abhängigen Nitrit- und Sulfit-Reduktasen aus Pflanzen als zu CysI aus *E. coli*. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass *C. glutamicum* zwei putative NADP-Ferredoxin-Reduktasen (Fpr1 und Fpr2) besitzt, von denen Fpr2 im Sulfatreduktionsgenclusters kodiert ist. Weiterhin kodiert der Gencluster noch für CysX, ein kleines, Ferredoxin-ähnliches Protein (Rückert *et al.*, 2005). Zusammengenommen sind diese Komponenten vermutlich für die Reduktion von Sulfit zu Sulfid verantwortlich. An der Bereitstellung des für CysI essentiellen Kofaktors Sirohäm sind wahrscheinlich die Proteine CysY und CysG beteiligt, die Ähnlichkeit mit einer Sirohydrochlorin-Ferrochelatase sowie einer Uroporphyrinogen-III-Synthetase aufweisen (Rückert *et al.*, 2005).

Außer mit anorganischen Schwefelquellen wie Sulfat, Sulfit und Sulfid kann *C. glutamicum* auch mit organischen Schwefelquellen wachsen, u. a. auf Aminosäuren wie L-Cystein, L-Cystathionin oder L-Methionin (Rückert & Kalinowski, 2008). Weiterhin besitzt *C. glutamicum* auch die zwei Gencluster *ssuD1CBA* und *ssuI-seuABC-ssuD2*, die das Bakterium zur Aufnahme und Verwertung von Sulfonaten und Sulfonatestern befähigen (Koch *et al.*, 2005b).

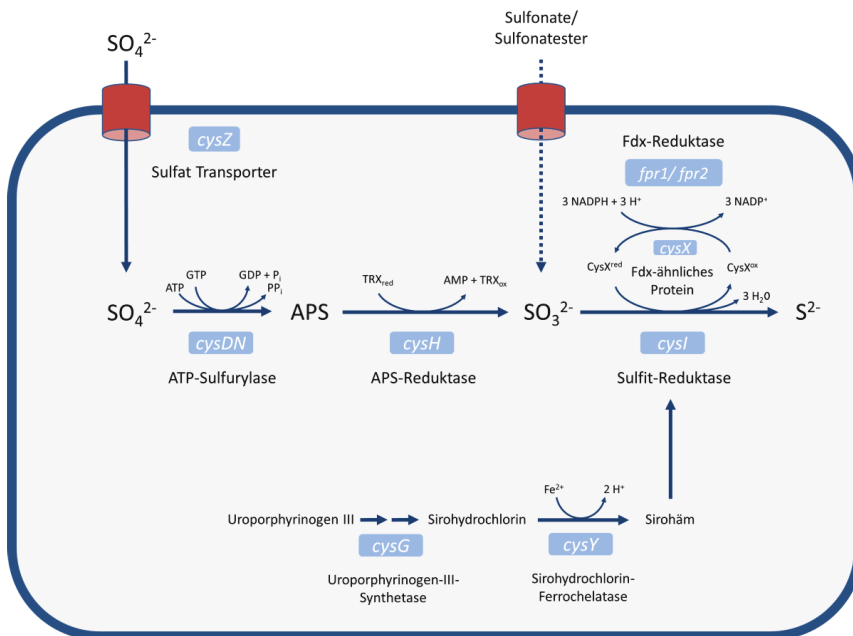


Abb. 1.2: Modell der assimilatorischen Sulfat-Reduktion in *C. glutamicum*. Verändert nach Lee (2005) und Rückert & Kalinowski (2008).

1.2.3 Transkriptionsregulation des Schwefel-Metabolismus

Die strenge Regulation des Schwefel-Metabolismus ist unabdingbar, da Sulfid für die Zellen toxisch ist und deshalb die Akkumulation von Sulfid über den Bedarf hinweg verhindert wird.

Der Transkriptionsregulator McbR wurde als Hauptregulator des Schwefel-Metabolismus identifiziert (Rey *et al.*, 2005). McbR gehört zur TetR-Proteinfamilie und ist ein Repressor (Brune *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2005). Zu den regulierten Genen gehören die Gene der L-Methionin- und L-Cystein-Synthese sowie Gene für die Aufnahme und Assimilation von schwefelhaltigen Molekülen (Rey *et al.*, 2005). *In vitro*-Analysen ergaben, dass der Effektor von McbR S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) ist, welches ein Derivat des L-Methionin-Stoffwechsels darstellt und an verschiedenen Transmethylierungsreaktionen beteiligt ist (Rey *et al.*, 2005). SAH gilt als Indikator für Zellwachstum, da z. B. neu synthetisierte DNA methyliert werden muss und diese Reaktion erhöhte SAH-Synthese erfordert. Allerdings gibt es neuere Ergebnisse, die zeigen, dass sowohl SAH als auch S-Adenosyl-L-Methionin (SAM), der Vorläufer von SAH, als Effektoren fungieren und möglicherweise die Gene der L-Methionin-Biosynthese in Antwort auf das Verhältnis von SAM zu SAH reguliert werden (Suda *et al.*, 2008). Weiterhin reprimiert McbR noch die Gene von zwei weiteren Transkriptionsregulatoren, CysR und SsuR, die zur ROK-Proteinfamilie gehören und für die Feinabstimmung der Genregulation des Schwefel-Metabolismus verantwortlich sind (Koch *et al.*, 2005a; Rey *et al.*, 2005; Rückert *et al.*, 2008).

Bei CysR handelt es sich um einen dualen Transkriptionsregulator, der sowohl als Aktivator als auch als Repressor fungieren kann und unter anderem die Gene des Schwefelclusters *fpr2-cysIXHDNYZ* reguliert. Durch *in vitro*-Analysen konnten die Schwefel-Akzeptor-Moleküle OAS und OAH als Effektoren nachgewiesen werden (Rückert *et al.*, 2008). Daraus ergibt sich, dass CysR bei einem Anstau von OAS und OAH in der Zelle die Gene für die assimilatorische Sulfat-Reduktion aktiviert, Sulfid gebildet wird und direkt bei der Synthese von L-Cystein und L-Methionin eingesetzt werden kann. Damit ist gewährleistet, dass das für die Zelle toxische Sulfid nicht akkumuliert. Neben den Genen für die assimilatorische Sulfat-Reduktion kontrolliert CysR noch weitere Gene, deren Funktionen noch nicht bekannt sind, sowie den Transkriptionsregulator SsuR (Rückert *et al.*, 2008). Weiterhin stehen die meisten Gene des CysR-Regulons auch unter Repression von McbR.

Der Transkriptionsregulator SsuR aktiviert die Expression von Genen für die Verwertung von Sulfonaten und Sulfonatestern, wenn kein Sulfat verfügbar ist. Es konnte durch *in vitro*-Studien gezeigt werden, dass SsuR in Anwesenheit von Sulfat und seinen Assimilationsprodukten APS, Sulfit und Sulfid nicht an seine Ziel-DNA binden kann (Koch *et al.*, 2005a). Alle Gene des SsuR-Regulons werden von McbR reprimiert und sind damit unter direkter Transkriptionskontrolle von McbR (Rey *et al.*, 2005, s. Abb.1.3).

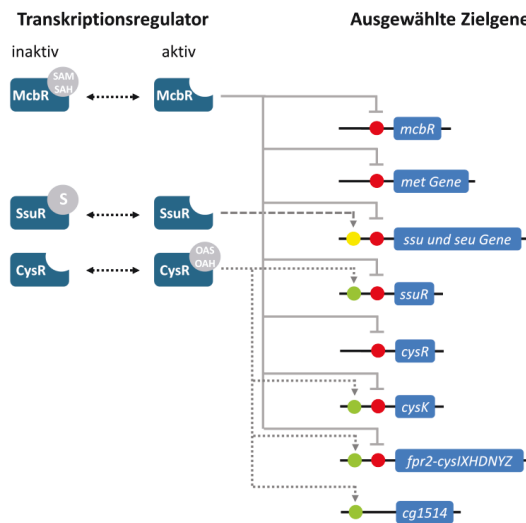


Abb. 1.3: Modell der Transkriptionsregulation des Schwefel-Metabolismus in *C. glutamicum*. Transkriptionsaktivierung ist mit Pfeilen dargestellt, wohingegen Transkriptionsrepression durch Striche gezeigt ist. In Rot sind die Bindestellen für den Repressor McbR dargestellt, in Grün die Bindestellen für den Aktivatoren CysR sowie in Gelb die Bindestelle für SsuR. Verändert nach Rückert (2008).

1.2.4 Industrielle Bedeutung und Herstellung von L-Cystein

Die Anwendungen von L-Cystein sind vielfältig und der weltweite Markt für L-Cystein bedarf einer jährlichen Produktion von etwa 5000 Tonnen, was einem Marktwert von 55 Millionen US \$ entspricht (Haas *et al.*, 2009). Davon finden bis zu 30 % ihren Einsatz in der pharmazeutischen Industrie für die Herstellung des Wirkstoffs *N*-Acetylcystein. *N*-

Acetylcystein findet Verwendung als Schleimlöser bei bronchialen Erkrankungen (Haas *et al.*, 2009; Ziment, 1988). Ein weiterer Bedarf für L-Cystein besteht auch in der Lebensmittelindustrie. Als Lebensmittelzusatzstoff E920 wird es als Backzusatz verwendet (Harinder & Bains, 1988; Kaur & Bains, 1980). In Anwesenheit von L-Cystein werden die Disulfidbrücken von Gluten reduziert, der Teig dadurch knetfähiger und es kann eine Verbesserung des Teigvolumens erreicht werden. Zusätzlich bleibt der Teig weniger an den Verarbeitungsmaschinen kleben (Haas *et al.*, 2009). L-Cystein wird weiterhin als Ausgangsstoff für Fleisch-Aromen eingesetzt, die mithilfe von reduzierenden Zuckern in der Maillard-Reaktion hergestellt werden (Ledl & Schleicher, 1990). In der kosmetischen Industrie findet sich L-Cystein in Produkten für Dauerwellen. Dabei wird es durch die Reduktion der Disulfidbrücken von Keratin möglich, die Vernetzung zwischen den einzelnen Molekülen kurzzeitig aufzubrechen und den Haaren eine neue Struktur zu geben. Zusätzlich wird L-Cystein Anti-Aging-Produkten sowie Präparaten zur Hautaufhellung beigefügt (Haas *et al.*, 2009).

Die industrielle Herstellung von L-Cystein wird mithilfe verschiedener Methoden durchgeführt. Mit etwa 90 % wird der Großteil des Bedarfs durch die saure Hydrolyse keratinhaltiger Naturstoffe wie Federn, Haaren und Schweineborsten bereitgestellt und somit stellt L-Cystein eine der wenigen Aminosäuren dar, die nach wie vor mit dieser klassischen Methode hergestellt werden (Ikeda, 2003). Nach der Behandlung mit Salzsäure fällt durch Neutralisation das schwerlösliche L-Cystin aus. Dieses Disulfid entsteht durch Oxidation von zwei L-Cystein Molekülen. Die anschließende Reduktion zu L-Cystein erfolgt mittels Elektrolyse. Der große Nachteil dieser konventionellen Methode ist jedoch der hohe Verbrauch an Salzsäure, der mit 27 kg pro 1 kg L-Cystein zu einer Herausforderung in der Behandlung von Abwässern und gegebenenfalls auch zu Umweltproblemen führt (Haas *et al.*, 2009). Neben dieser konventionellen Methode gibt es auch biotechnologische Prozesse. Diese haben den Vorteil, dass keine tierischen Rohstoffe eingesetzt werden müssen und damit eine Kontamination mit BSE oder SARS ausgeschlossen werden kann, was für die pharmazeutische Industrie unerlässlich ist. Einer dieser Prozesse ist die Biokonversion von D,L-amino-thiazol-4-carboxylsäure (DL-ATC) zu L-Cystein mithilfe von *Pseudomonas*-Stämmen (Wada & Takagi, 2006), der jedoch nur einen geringen Anteil am Weltmarkt hat. Die Umwandlung des chemisch synthetisierten DL-ATC zu L-Cystein besteht aus drei enzymatischen Schritten: Zunächst wird D-ATC zu L-ATC racemisiert, anschließend findet die Ringöffnung von L-ATC statt und N-carbamoyl-L-Cystein (L-NCC) entsteht als Intermediat. Im letzten Schritt wird L-NCC zu L-Cystein hydrolysiert. Ein fermentativer Prozess mit *E. coli* wurde von der Firma WACKER AG etabliert und 2001 patentiert (Maier & Winterhalter, 2001). Dieser stellt zwar mit 500 Tonnen Jahresproduktion und einer jährlichen Zuwachsrate von 10 % noch einen relativ geringen Anteil dar, gewinnt aber zunehmend an Bedeutung (Haas *et al.*, 2009).

1.3 Metabolitsensoren

Die Fähigkeit eines Organismus intrazelluläre oder extrazelluläre Signale wahrzunehmen und angemessen darauf zu reagieren, ist für das Überleben wesentlich. Das Erkennen von Metabolit-Konzentrationen dient hierbei als Hilfsmittel, um den Zustand der Zelle zu erfassen. Analytische Methoden zur Untersuchung von Metabolit-Konzentrationen haben

den Nachteil, dass sie aufgrund von Probenpräparation und der benötigten Probenmenge eine limitierte zeitliche und räumliche Auflösung haben (Ewald *et al.*, 2011). Die *in vivo* Untersuchung von Metaboliten mithilfe von Biosensoren ist somit ein wertvoller Beitrag zum Verständnis des zellulären Stoffwechsels. Auf molekularer Ebene hat die Natur sowohl RNA als auch Proteine evolviert, um Metabolite zu erkennen und eine zelluläre Antwort auslösen zu können (Dietrich *et al.*, 2010). Genetisch kodierte Sensoren für zelluläre Metabolite können direkt aus biologischen Systemen entnommen oder ausgehend von diesen verändert werden. Die *in vivo*-Visualisierung in Einzelzellen oder in Kulturen erfolgt durch die Kombination eines Sensorelements mit einem Reporter, wie z. B. einem Fluoreszenzprotein. Der entstandene Metabolitsensor sollte eine ausreichende Spezifität und Sensitivität gegenüber dem zu detektierenden Molekül aufweisen. Der Vorteil bei der Verwendung von nativen Systemen ist hierbei die Spezifität und die Sensitivität gegenüber dem Metaboliten (Dietrich *et al.*, 2010; van Rossum *et al.*, 2013). Die meisten vorhandenen und verwendeten Systeme lassen sich grundsätzlich in RNA- und Protein-Sensoren unterteilen (Gredell *et al.*, 2012).

RNA-Sensoren beruhen auf RNA-Aptameren, die in der Lage sind, einen bestimmten Metaboliten zu binden. Ein Aptamer kann z. B. mit einer Ribosomenbindestelle (RBS) fusioniert werden und diese in Abwesenheit des Metaboliten blockieren. Wenn der Metabolit verfügbar ist und an das Aptamer bindet, führt eine Konformationsänderung zur Freilegung der RBS und die mRNA eines fusionierten Reportergens kann translatiert werden (Desai & Gallivan, 2004). Eine andere Möglichkeit ist die Kombination eines Aptamers mit einem Ribozym. Eine mögliche Konstruktion funktioniert nach folgendem Prinzip: In Abwesenheit des Metaboliten liegt das Ribozym in aktiver Form vor und das Transkript des Reportergens wird durch das Ribozym abgebaut. In Anwesenheit des Metaboliten ist das Ribozym inaktiv und das Reporterprotein wird gebildet (Michener *et al.*, 2012).

Protein-Sensoren lassen sich noch einmal in FRET-Sensoren und Sensoren, die auf Transkriptionsregulatoren beruhen, einteilen. Das Prinzip eines FRET-Sensors (Förster-Resonanzenergietransfer) beruht auf einem Energietransfer zwischen zwei Chromophoren, wenn diese in eine enge räumliche Nähe zueinander kommen (Gaits & Hahn, 2003). Üblicherweise werden mit dieser Methode Protein-Protein-Interaktionen untersucht, jedoch kann sie auch zur Detektion von Metaboliten eingesetzt werden. Die beiden Chromophore werden an ein Bindeprotein fusioniert, welches seine Struktur nach Bindung des Liganden ändert und die Chromophore dadurch in räumliche Nähe bringt (Gaits & Hahn, 2003). Mittlerweile gibt es bereits einige FRET-Sensoren, die eine Reihe unterschiedlicher Metabolite detektieren können, wie z. B. Zucker, Aminosäuren, Nukleotide und Ionen (Bermejo *et al.*, 2011).

Bei der Verwendung von Transkriptionsfaktoren als Metabolitsensoren wird die allosterische Regulation eines Transkriptionsfaktors durch einen Metaboliten genutzt, die in der Natur weit verbreitet ist. Dabei kann die Bindung des Metaboliten an den Transkriptionsfaktor entweder zur Derepression oder Aktivierung eines Zielgens führen. Für die Verwendung als Metabolitsensor wird der Promotor des Zielgens mit einem

Reportergeren fusioniert (Michener *et al.*, 2012). Diese Methode findet schon länger beim Aufspüren von schädlichen, niedermolekularen Substanzen in der Umwelt mithilfe von Ganzzell-Biosensoren Anwendung, wo die Fluoreszenz von Kulturen Aufschluss über die Konzentration von Schwermetallen gibt (van der Meer & Belkin, 2010). Erst kürzlich ist dieses Prinzip auch auf die Einzelzellanalyse und die Selektion von Zellen mit erhöhter Aminosäurebildung übertragen worden (Binder *et al.*, 2012; Mustafi *et al.*, 2012).

1.4 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein rationaler Ansatz zur Entwicklung eines *C. glutamicum* L-Cystein-Produzenten ausgehend von einem guten L-Serin-Produzenten untersucht werden. Weiterhin sollte ein Metabolitsensor zur Detektion der intrazellulären Intermediate des L-Cystein- und L-Methionin-Stoffwechsels *O*-Acetyl-L-Serin und *O*-Acetyl-L-Homoserin zur Untersuchung der intrazellulären Schwefel-Verfügbarkeit entwickelt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden Chemikalien und Enzyme der Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe), Roche Diagnostics (Mannheim), Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen), Bachem Biochemica AG (Heidelberg), AppliChem GmbH (Darmstadt), VWR (Radnor, USA) und BD (Franklin Lakes, USA) verwendet.

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 2.1 sowie die verwendeten Plasmide in Tab. 2.2 dargestellt.

Tab. 2.1: Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Merkmale	Referenz
<i>E. coli</i>		
DH5 α MCR	F- <i>endA1 supE44 thi-λ- recA1 gyrA96relA1 deoR</i> $\Delta(lacZYA-argF)$ <i>U169Φ80dlacZM15 mcrA $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$</i>	Grant <i>et al.</i> (1990)
BL21(DE3)	F- <i>ompT gal dcm hsdSB(rB- mB-) λ(DE3)</i>	Novagen
<i>C. glutamicum</i>		
ATCC13032	Wildtyp (WT), biotin-auxotroph	Abe <i>et al.</i> (1967)
WT $\Delta sdaA\Delta pabABC$	WT mit <i>in frame</i> Deletion von <i>sdaA</i> und <i>pabABC</i>	Stolz <i>et al.</i> (2007)
Ser4	L-Serin-Produktionsstamm, WT $\Delta sdaA\Delta pabABC$ <i>pserACB Tet^R</i>	Stolz <i>et al.</i> (2007)
Ser4-1	WT $\Delta sdaA\Delta pabABC$ mit <i>in frame</i> Deletion der letzten 197 Codons des <i>serA</i> -Gens, gefolgt von den Basen GGTACCGAGCTCGAATTACTGCGGCTCGCTGA, die für 10 zusätzliche Aminosäuren (GTELELLRRR) und ein Stopcodon kodieren (<i>serAΔ197</i>)	diese Arbeit
Ser4-2	WT $\Delta sdaA\Delta pabABC$ mit <i>in frame</i> Deletion der letzten 197 Codons des <i>serA</i> -Gens (<i>serAΔ197^{stop}</i>). Im Gegensatz zu Ser4-1 sind keine zusätzlichen Basen im <i>open reading frame</i> .	diese Arbeit
Ser4-3	Ser4-2 mit Promotoraustausch vor <i>serA</i> durch 179 bp-Fragment der P _{tuf} Promotorregion	diese Arbeit
Ser4 $\Delta aecD$	Ser4 mit <i>in frame</i> Deletion von <i>aecD</i>	Hoffmann <i>et al.</i> (2013)
Ser4 $\Delta aecD\Delta metB$	Ser4 mit <i>in frame</i> Deletion von <i>aecD</i> und <i>metB</i>	diese Arbeit
Ser4 $\Delta metX$	Ser4 mit <i>in frame</i> Deletion von <i>metX</i>	diese Arbeit
Ser4 $\Delta aecD\Delta metX$	Ser4 mit <i>in frame</i> Deletion von <i>aecD</i> und <i>metX</i>	diese Arbeit
KK42	WT mit <i>lysC^{fbr}</i> , <i>hom^{fbr}</i> , Punktmutation in <i>leuCD</i> führt zur Leucin-Auxotrophie	Morbach <i>et al.</i> (1996)

Tab. 2.2: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pserACB (pEC-T18mob2serA ^{fbr} CB)	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle-Vektor, Tet ^R , oriV _{Cg} , oriV _{Ec} , mob, mit serA ^{fbr} (serAΔ197), serC, und serB und deren nativen Promotoren	P. Peters-Wendisch
pEC-T18mob2serCB	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle-Vektor, Tet ^R , oriV _{Cg} , oriV _{Ec} , mob, mit serC und serB und deren nativen Promotoren	Peters-Wendisch <i>et al.</i> (2005)
pZ1	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle-Vektor, Kan ^R , oriV _{Cg} , oriV _{Ec}	Menkel <i>et al.</i> (1989)
pZ1serAΔ197	pZ1 mit verkürztem serA (serAΔ197) und dessen nativem Promotor	Peters-Wendisch <i>et al.</i> (2002)
pK19mobsacB	Integrationsvektor, Kan ^R , oriV _{Ec} , oriT, sacB, mob	Schäfer <i>et al.</i> (1994)
pK19mobsacB_serAΔ197	pK19mobsacB mit <i>in frame</i> Deletion der letzten 197 Codons des serA-Gens gefolgt von den Basen GGTACCGAGCTCGAATTACTGCGGCGTCGCTGA, die für 10 zusätzliche Aminosäuren und ein Stopcodon kodieren	diese Arbeit
pK19mobsacB_serAΔ197^{stp}	pK19mobsacB mit <i>in frame</i> Deletion der letzten 197 Codons des serA-Gens	diese Arbeit
pK19mobsacB_P_{tuf}serAΔ197st P	pK19mobsacB mit 179 bp-Fragment der P _{tuf} Promotorregion	diese Arbeit
pK19mobsacBΔaecD	pK19mobsacB mit <i>in frame</i> Deletion von aecD	Rückert <i>et al.</i> (2003)
pK19mobsacBΔmetX	pK19mobsacB mit <i>in frame</i> Deletion von metX	Rückert <i>et al.</i> (2003)
pK19mobsacBΔmetB	pK19mobsacB mit <i>in frame</i> Deletion von metB	Rückert <i>et al.</i> (2003)
pEKEx3	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle-Vektor zur regulierten Genexpression, Spec ^R , P _{tac} , lacI ^q , oriV _{Cg} , oriV _{Ec}	Hoffelder <i>et al.</i> (2010)
pBSSKNtSAT4	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor (pBluescript) zur regulierten Genexpression von cysE aus <i>N. tabacum</i> , T7-Promotor, lacI, Amp ^R ,	M. Wirtz, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
pNTSAT4	pEKEx3 mit cDNA von cysE aus <i>N. tabacum</i>	diese Arbeit
pEcSAT^{wt}	pEKEx3 mit cysE ^{wt} aus <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pEcSAT^{V95R,D96P}	pEKEx3 mit cysE aus <i>E. coli</i> mit Austausch der Codons für V95R und D96P	diese Arbeit
pEKEx2	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle-Vektor zur regulierten Genexpression, Kan ^R , P _{tac} , lacI ^q , oriV _{Cg} , oriV _{Ec}	Eikmanns <i>et al.</i> (1991)
pcysE	pEKEx2 mit cysE aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pcysKE	pEKEx2 mit cysE und cysK aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pcysR	pEKEx2 mit cysR aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pBHC18	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle-Vektor, Cm ^R , <i>oriV_{Cg}</i> , <i>oriV_{Ec}</i>	Kirchner & Tauch (2003)
pRedOp	pBHC18 mit <i>fpr2-cysIXHDNYZ</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pJC1	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle-Vektor, Kan ^R , <i>oriV_{Cg}</i> , <i>oriV_{Ec}</i>	Cremer <i>et al.</i> (1990)
pSenLys	pJC1 mit <i>lysG</i> und dessen nativem Promotor, P _{lysE} mit ersten 63 bp des <i>open reading frames</i> von <i>lysE</i> und transkriptioneller Fusion mit <i>eyfp</i>	Binder <i>et al.</i> (2012)
pSenOAS1	pJC1 mit <i>cysR</i> und dessen nativem Promotor, P _{NCgl1289} mit ersten 96 bp des <i>open reading frames</i> von NCgl1289 und transkriptioneller Fusion mit <i>eyfp</i>	Hoffmann <i>et al.</i> (2013)
pSenOAS3	pJC1 mit <i>cysR</i> und dessen nativem Promotor, P _{cysI} mit ersten 126 bp des <i>open reading frames</i> von <i>cysE</i> und transkriptioneller Fusion mit <i>eyfp</i>	Hoffmann <i>et al.</i> (2013)
pP_{cysR}cysR+P_{NCgl1289}	pJC1 mit <i>cysR</i> und dessen nativem Promotor, P _{NCgl1289} mit ersten 96 bp des ORFs	diese Arbeit
pP_{cysR}cysR	pJC1 mit <i>cysR</i> und dessen nativem Promotor	diese Arbeit
pCLTON2	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle-Vektor zur regulierten Genexpression, Spec ^R , P _{tet^r} , <i>oriV_{Cg}</i> , <i>oriV_{Ec}</i>	Lausberg <i>et al.</i> (2012)
pCLTON2metX	pCLTON2 mit <i>metX</i> aus <i>C. glutamicum</i>	Hoffmann <i>et al.</i> (2013)
pEvol-pAzF	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor, ermöglicht den Einbau der unnatürlichen Aminosäure <i>p</i> -Azidophenylalanin (pAzF) durch Expression eines orthogonalen, pAzF-spezifischen Aminoacyl-tRNA-Synthetase (pAzF-aaRS)/tRNA-Paares; Cm ^R , trägt zwei Kopien des Gens pAzF-aaRS unter Kontrolle der Promotoren P _{araBAD} und P _{glnS} und kodiert für die pAzF-spezifische tRNA	Young <i>et al.</i> (2010)
pCDF-1b-cpGFP-TAG	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor zur regulierten Genexpression von <i>cpGFP-TAG</i> mit N-terminalem His-Tag, Spec ^R , T7-Promotor, <i>lacI</i>	Chen <i>et al.</i> (2012)

2.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden ausschließlich von der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) synthetisiert und sind in Tabelle 2.3 aufgelistet.

Tab. 2.3: Verwendete Oligonukleotide. Ribosomenbindestellen (Martin *et al.*, 2003) sind fett dargestellt, Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen. Gewünschte Mutationen zur ortsgerichteten Mutagenese sind klein geschrieben.

Name	Sequenz (5'-3')	Merkmale
Deletion <i>serA</i>Δ197 und <i>serA</i>Δ197^{stp}		
Konstruktion		
<i>serA</i> Δ1	GCGCT <u>GCAG</u> GCCAGATCATCATCAAC	<i>Pst</i> I
<i>serA</i> Δ2	GCGACGCCGAGTAATTCGAGCTCGGTACCAGCCAGATCCATCC	
<i>serA</i> Δstp2	AGCCAGATCCATCC	
<i>serA</i> Δ3	GGTACCAGACTCGAATTACTGCGGCGTCGTAATTAGAGATCCATTGCTTG	
<i>serA</i> Δstp3	CTGTGTGGATGGATCTGGCTTAATTAGAGATCCATTGCTTG	
<i>serA</i> Δ4	GATG <u>GATCC</u> GGGCAGAGTTAATCGCCACA	<i>Bam</i> HI
Screening		
<i>serA</i> Δ197_scrn1	GCTGATGAGCCGTTCTGACTTT G	
<i>serA</i> Δ197_scrn2	CCGCCTTAAGCACCGTTGTCAG	
Promotoraustausch <i>serA</i>		
Konstruktion		
<i>PserA</i> 1	<u>GGATCC</u> AAACCGGACAGGATTGCC	<i>Bam</i> HI
<i>PserA</i> 2	GTGAGATTACCCCAAAGG	
<i>Peftu</i> 1	CCTTTGGGGGTAATCTCACCCACAGGGTAGCTGGTAGTTTG	
<i>Peftu</i> 2	ACGGCCATTCTGGCTCACTGTATGTCCTCTGGACTTCGTGG	
<i>PserA</i> 3	GTGAGCCAGAATGGCCGTCGGTAG	
<i>PserA</i> 4	<u>GAATTC</u> CTCTCAAACGCAGCAAGACGC	<i>Eco</i> RI
Screening		
<i>PserA</i> _scrn1	GAGCGGTGAGTTAGCTTTTCGAC	
<i>PserA</i> _scrn2	GAGCAGGGTTAGCGTAAGGATCG	
Deletion <i>aecD</i>		
Screening		
<i>aecD</i> _scrn1	CGGGGTAGGTTCCCTAAAATTC	
<i>aecD</i> _scrn2	CCACGAGAAGCCATGTCCTTG	
Deletion <i>metB</i>		
Screening		
<i>metB</i> _scrn1	CATCGGAAGGCACCGTGGACATC	
<i>metB</i> _scrn2	TCAACTCTGGCGGCCACTTC	

Name	Sequenz (5'-3')	Merkmale
Deletion <i>metX</i>		
Screening		
metX_scrn1	CTACTTCGCTCACTCCAGATG	
metX_scrn2	CACCAGTTGTTCCGCAGCTT	
Konstruktion pNtSAT4		
NtSAT4_for	<u>CTGCAG</u> AAGGAG ATATAGATATGCGTAACGAAGAGGAAGACGATTG	<i>Pst</i> I, RBS
NtSAT4_rev	<u>GGATCC</u> CTAAATTACATAATCAGACCACTC	<i>Bam</i> HI
Konstruktion pEcSAT^{wt}		
eco_cysE-for	<u>GACTGCAG</u> AAGGAG ATATAGATATGTCGTGTGAAGAACTGGAAATTG	<i>Pst</i> I, RBS
eco_cysE-rev	CGCGCG <u>GGATCC</u> TTATTATTAGATCCCATCCCCATACTCA	<i>Bam</i> HI
Konstruktion pEcSAT^{V95R,D96P}		
eco_cysE-for	<u>GACTGCAG</u> AAGGAG ATATAGATATGTCGTGTGAAGAACTGGAAATTG	<i>Pst</i> I, RBS
cysE_mut2	GGGTTGAGTATTTgggtctTGCCGGGTCGCGGGTACG	V95R, D96P
cysE_mut3	CGACCCGGCAagaccAAATACTCAACCCGTTGTTATAC	V95R, D96P
eco_cysE-rev	CGCGCG <u>GGATCC</u> TTATTATTAGATCCCATCCCCATACTCA	<i>Bam</i> HI
Konstruktion pcysE		
cysE_for	CGGGCCGCTGCAG AAGGAG ATATAGATATGCTCTCGACAATAAAAAT G	<i>Pst</i> I, RBS
cysE_rev	GCGCCGGGATCCTTATTATTAAATGTAATAGTCCGGATCGACG	<i>Bam</i> HI
Konstruktion pcysKE		
cysKE_for	CGGGCCGCTGCAG AAGGAG ATATAGATATGGGCAATGTGTACAAC	<i>Pst</i> I, RBS
cysKE_rev	GCGCCGGGATCCTTATTATTAAATGTAATAGTCCGGATCGACG	<i>Bam</i> HI
Konstruktion pcysR		
cysR_for1	<u>GGATCC</u> AAGGAG ATATAGATATGATTGGCTATGGTTTACCTATGC	<i>Bam</i> HI
cysR_rev1	<u>GGTACCT</u> TATTATTAGGGTACGAGAGTAAGTG	<i>Kpn</i> I
Konstruktion pRedOp		
SRO_for	TCCCGGAAAGCGAAAGTCCC	
SRO_rev	CCGCTTTCCTTCTGAATG	
Konstruktion pSenOAS1		
cysR_rev2	GACGTCGACTTAGGGTACGAGAGTAAGTG	<i>Sal</i> I

Name	Sequenz (5'-3')	Merkmale
cysR_for2	GCAGGTTGGACGGTATTATG	
NCgl1289_for	CATAATACCGTCCAACCTGCCACTACACCACAGGCTTC	
NCgl1289_rev_RBS	<u>CATATGATATCTCCTT</u> CTTAAAGTTCAGCTTTGTGCA GTGGAAGTAGGG CTTAG	<i>NdeI</i> , RBS
Konstruktion pSenOAS3		
cysR_rev2	GAC <u>GTCGAC</u> TTAGGGTACGAGAGTAAGTG	<i>SalI</i>
cysR_for2	GCAGGTTGGACGGTATTATG	
cysI_for	CATAATACCGTCCAACCTGCATATTCACGGTGAACCTAAC	
cysI_rev_RBS	<u>CATATGATATCTCCTT</u> CTTAAAGTTCAGGGTCTTCTTGCTTAATTCCTC G	<i>NdeI</i> , RBS
Konstruktion pP_{cysR}cysR+P_{NCgl1289}		
cysR_rev2	GAC <u>GTCGAC</u> TTAGGGTACGAGAGTAAGTG	<i>SalI</i>
cysR_for2	GCAGGTTGGACGGTATTATG	
NCgl1289_for	CATAATACCGTCCAACCTGCCACTACACCACAGGCTTC	
NCgl1289_rev2	TAGC <u>GGATCCC</u> ATATGATATCTCCTTCTTAAAGTTC	<i>BamHI</i>
Konstruktion pP_{cysR}cysR		
cysR_rev2	GAC <u>GTCGAC</u> TTAGGGTACGAGAGTAAGTG	<i>SalI</i>
cysR_for3	TAGC <u>GGATCCG</u> CAGGTTGGACGGTATTATG	<i>BamHI</i>
Konstruktion pCLTONmetX		
metX_for	GTAC <u>CTGCAGAA</u> GGAGATATAGATATGCCACCCTCGCGCTTCAG	<i>PstI</i> , RBS
metX_rev	GCG <u>CCCCGGG</u> TATTAGATGTAGAACTCGATGTAGG	<i>SmaI</i>
Sequenzierung		
pEKEx2_fw	CGGCGTTTCACTTCTGAGTTCGGC	
pEKEx2_rv	GATATGACCATGATTACGCCAAGC	
Pcl_fw	GTA ACTATTGCCGATGATAAGC	
rsp	CACAGGAAACAGCTATGACCATG	
uni	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	
ppJC1_for	ACAAGCCACCCGACAACGT	
ppJC1_rev	ACTGTCATGCCATCCGTAAG	
seq_serAD197	TCCACCGAGCCTTGCACTGATTC	
Seq_cysR	GGCCTCGACCAGCTCATTTTC	
SRP1	TGTGCTGCAAGGCGATTAAG	
SRP2	ACGAAACCACCGACAATACC	
SRP3	GACTGATTCATTGGCGGACAC	

Name	Sequenz (5'-3')	Merkmale
SRP4	GCCAAGCCAACAACAGTG	
SRP5	GGTATCAGCCAGGATGAAGG	
SRP6	CGAAGGAGTCACGCACAGAG	
SRP7	TGGGTTTCTCCGAAGACTC	
SRP8	CGAGGTATTCGGTCTCAAG	
SRP9	GCTTACGCTGGGTGTAAATG	
SRP10	CCTCCTCATCCGCAATGAAG	
SRP11	TGCAGATCCACCTCTTTG	
SRP12	TTATGCTTCCGGCTCGTATG	
SRP13	GCAGACTGTCCCTTTGGTG	
SRP14	CGCTGTAATCAACAAGG	

2.4 Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung von Bakterien

2.4.1 Nährmedien

Zur Kultivierung und Stammhaltung von *E. coli*-Stämmen wurde LB-Vollmedium nach Sambrook & Russell (2001) verwendet. Für die Proteinexpression wurde 2 x YT (Sambrook & Russell, 2001) eingesetzt. Die Anzucht zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte mit SOB-Medium (Hanahan, 1983).

Als Vollmedium für *C. glutamicum*-Vorkulturen wurde BHI-(*Brain-Heart-Infusion*, BD, Franklin Lakes, USA) oder CGIII-Medium (Menkel *et al.*, 1989) genutzt. Die Anzucht zur Herstellung kompetenter *C. glutamicum*-Zellen und deren Regeneration nach erfolgter Transformation erfolgte ebenfalls mit BHI, dem noch 0,5 M Sorbitol zugesetzt wurde (BHIS). Für die Kultivierung von Hauptkulturen wurde das Minimalmedium CGXII (Keilhauer *et al.*, 1993) mit 4 % (w/v) Glukose oder das schwefelfreie Minimalmedium MMES (Rückert *et al.*, 2005) mit 2 % (w/v) Glukose, 30 mg/l Protokatechusäure und verschiedenen Konzentrationen von Na₂SO₄ eingesetzt.

Zur Selektion rekombinanter *E. coli*-Stämme wurden dem Medium Antibiotika in den folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Chloramphenicol	30 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Tetrazyclin	12,5 µg/ml
Spectinomycin	100 µg/ml

Zur Induktion der Genexpression in *E. coli* wurden die Kulturen bei Verwendung des T7-Promotors mit 1 mM IPTG bzw. bei der Verwendung des Promotors P_{araBAD} mit 0,02 % (w/v) Arabinose induziert.

Die Selektion rekombinanter *C. glutamicum*-Stämme erfolgte mit folgenden Antibiotika:

Kanamycin	50 µg/ml (zur Vermeidung von Plasmidverlust)
	25 µg/ml (bei Integration eines Vektors ins Genom)
	15 µg/ml (unmittelbar nach der Elektroporation)
Tetrazyclin	12,5 µg/ml
Spectinomycin	250 µg/ml

Zur Induktion der *tet*-Promotor-abhängigen Genexpression wurden die Kulturen mit verschiedenen Konzentrationen von Anhydrotetrazyclin (ATC) induziert. Die Selektion auf Exzision der Vektorderivate von *pK19mobsacB* aus dem Genom von *C. glutamicum* erfolgte auf LB-Medium mit 10 % (w/v) Saccharose (Schäfer *et al.*, 1994). Zur Kultivierung des Folsäure-auxotrophen Ser4-Stamms und seinen Derivaten wurde dem Medium in der Hauptkultur 0,5 mM Folsäure zugesetzt. Zur Supplementation von Aminosäure-Auxotrophien wurden die Aminosäuren in Wasser gelöst und steril filtriert in einer Endkonzentration von 2 mM zu den autoklavierten Medien gegeben.

Zur Herstellung von Agarplatten wurden die Medien mit 1,5% (w/v) Agar (BD, Franklin Lakes, USA) versetzt.

2.4.2 Kultivierung von *E. coli*-Stämmen

Die Kultivierung von *E. coli*-Stämmen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in 50-100 ml Medium in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen oder in 5 ml Medium in Reagenzgläsern. Die Kulturen wurden bei 37 °C schüttelnd (120 Upm für Kolben, 170 Upm für Reagenzgläser) inkubiert. Für die Proteinproduktion wurde die Inkubationstemperatur auf 26 °C reduziert, um die Bildung von Einschlusskörperchen zu vermeiden.

2.4.3 Kultivierung von *C. glutamicum*-Stämmen

Die Kultivierung von *C. glutamicum*-Stämmen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in 50-100 ml Medium in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen oder in 5 ml Medium in Reagenzgläsern. Die Kulturen wurden bei 30°C schüttelnd (120 Upm für Kolben, 170 Upm für Reagenzgläser) inkubiert. Für die Kultivierung wurden, wenn nicht anders vermerkt, Vorkulturen in 50 ml CGIII-Medium von Agarplatten angeimpft, die nicht älter als 7 Tage waren. Aus diesen wurden nach Kultivierung bei 30 °C und 120 Upm für 15 h nach dem Waschen der Zellen in steriler Saline (0,9 % NaCl) eine zweite Vorkultur in 50 ml Minimalmedium angeimpft und über Tag bei 30 °C inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen in steriler Saline wurde die Hauptkultur in 50 ml Minimalmedium angeimpft.

2.4.4 Kultivierung von *C. glutamicum* im BioLector

Kultivierungen von *C. glutamicum* im BioLector-System (m2p-labs GmbH, Baesweiler) wurden zur Verfolgung von *online* Wachstum und Fluoreszenz im Mikrotiterplattenformat durchgeführt. Als Mikrotiterplatten wurden FlowerPlates (m2p-labs GmbH, Baesweiler) eingesetzt, welche die Kultivierung von 48 parallelen Kulturen ermöglichen und durch ihre spezifische Geometrie eine optimale Durchmischung der Kulturen gewährleisten. In den FlowerPlates wurden 750 µl Minimalmedium mit Zellen aus einer Schüttelkolben-Vorkultur angeimpft (siehe Abschnitt 2.4.3) und bei 30 °C, 990 Upm und einer relativen

Luftfeuchtigkeit von 80 % inkubiert. Um Evaporation zu verhindern, aber Gastransfer zuzulassen, wurden die FlowerPlates mit einer selbstklebenden, Gas-durchlässigen Membran verschlossen. Das Wachstum wurde mittels Rückstreuung bei 620 nm gemessen. Die EYFP-Fluoreszenz der Kulturen wurde bei einer Exzitation von 510 nm und einer Emission von 532 nm gemessen. Die spezifische Fluoreszenz wird als Quotient von EYFP-Fluoreszenz und Rückstreuung angegeben.

2.4.5 Stammhaltung von Bakterien

Zur längerfristigen Stammhaltung wurden Kryokulturen angelegt. Dazu wurden 700 µl einer Übernachtskultur in ein mit 300 µl Glycerin (87 %, v/v) befülltes, steriles Kryoröhrchen überführt. Die so erhaltenen Zellsuspensionen wurden bei -80 °C gelagert und zum Beimpfen von Agarplatten verwendet.

2.4.6 Bestimmung des Wachstums von Bakterienkulturen

Das Wachstum von Bakterien in Flüssigkultur wurde anhand der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm mit einem Ultrospec 3300 pro Spectrophotometer (Amersham Biosciences, Freiburg) bestimmt. Eine lineare Abhängigkeit zwischen der Zelldichte und der optischen Dichte ist bis zu einer Extinktion von 0,5 gegeben. Lag die gemessene Extinktion über dieser Grenze, wurde die Probe mit dem entsprechenden Medium verdünnt.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Isolierung von DNA

2.5.1.1 Plasmid-Isolierung

Ausgehend von einer 5 ml Übernachtskultur erfolgte die Isolierung und Reinigung von Plasmiden aus *E. coli* im kleinen Maßstab mithilfe des NucleoSpin Plasmid Kits (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren), welches auf dem Prinzip der alkalischen Lyse beruht (Birnboim & Doly, 1979). Um größere Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* zu isolieren, wurden 50 ml einer Übernachtskultur verwendet und die DNA nach Herstellerangaben mithilfe des Plasmid Midi Kits (QIAGEN, Hilden) isoliert.

2.5.1.2 Isolierung chromosomaler DNA

Die Isolation genomischer DNA aus *C. glutamicum* erfolgte mithilfe des DNeasy Tissue Kits (QIAGEN, Hilden) aus 1 ml einer Übernachtskultur nach Angaben des Herstellers.

2.5.1.3 Reinigung von DNA

Um DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen oder enzymatischen Reaktion zu reinigen, wurde das NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren) nach Herstellerangaben benutzt.

2.5.1.4 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Zur Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrads von Nukleinsäuren fand das NanoDrop Spectrophotometer (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) Verwendung. Dazu wurde die Absorption der wässrigen Nukleinsäurelösung bei 260 nm bestimmt. Eine Absorption von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA in

einer wässrigen Lösung. Der Reinheitsgrad der DNA wurde anhand der Quotienten A_{260}/A_{280} bzw. A_{260}/A_{230} bestimmt, deren Werte zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollten. Bei starker Verunreinigung der DNA mit Proteinen oder Polysacchariden liegt der Wert unter 1,8.

2.5.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Trennung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Die Trennung erfolgte je nach Größe der DNA-Fragmente in 1-2 %igen (w/v) Agarosegelen in TAE-Puffer (40 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8 mit Essigsäure einstellen) nach Sambrook & Russell (2001). Die Proben wurden vor dem Auftragen mit DNA-Ladepuffer versetzt (6x: 0,2 % Bromphenolblau, 100 mM Na₂EDTA, 34 % (v/v) Glycerin). Als Größenstandard diente GeneRuler 1 kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Die Trennung erfolgte bei Feldstärken von 5-10 V/cm (Elektrodenabstand) für etwa 1 h. Nach der elektrophoretischen Trennung wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) gefärbt und das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid durch UV-Anregung sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Geldokumentationssystems Quantum (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen).

2.5.3 Rekombinante DNA-Techniken

2.5.3.1 Restriktion

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA wurde mittels Restriktionsendonukleasen nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Für präparative Ansätze wurde ein Volumen von 50-100 µl gewählt, wohingegen für analytische Arbeiten ein Volumen von 10-20 µl verwendet wurde. Die Ansätze enthielten i. d. R. 200 ng-5 µg DNA und 5-15 U des jeweiligen Enzyms. Die Inkubationszeit betrug 15 min bis 16 h bei vorgeschriebener Temperatur. Der Erfolg der Restriktion wurde mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.5.3.2 5'-Dephosphorylierung von linearer Plasmid-DNA

Zur Dephosphorylierung wurde die *Shrimp alkaline phosphatase* (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Die Phosphatase vermittelt die Entfernung von 5'-Phosphatgruppen von DNA. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.5.3.3 Ligation

Für Ligationen wurde das Rapid DNA Ligation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Herstellerangaben verwendet.

2.5.4 Transformationstechniken

2.5.4.1 Herstellung und Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen wurden diese mit RbCl₂ behandelt. Dazu wurden die Zellen in 50 ml SOB angezogen und nach Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 0,15 geerntet. Die weitere Durchführung erfolgte nach der Methode nach Hanahan (1985).

Zur Transformation wurden 200 µl kompetente *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA bzw. einem Ligationsansatz gemischt. Durch anschließende 30-minütige Inkubation auf Eis sollte die

Anlagerung der DNA an die Zellen erreicht werden. Ein kurzer Hitzeschock (90 s, 42 °C) diente der Unterstützung der DNA-Aufnahme in die Zellen. Nach Zugabe von 800 µl LB wurden die Zellen für 45 min bei 37 °C regeneriert. Anschließend wurden die Zellen auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert.

2.5.4.2 Herstellung und Transformation elektrokompetenter *C. glutamicum*-Zellen

Zur Transformation von *C. glutamicum* wurde die Methode der Elektroporation mit anschließendem Hitzeschock angewandt (Tauch *et al.*, 2002b). Für die Herstellung elektrokompetenter *C. glutamicum*-Zellen wurde eine Vorkultur aus 50 ml BHIS-Medium von einer frischen Agarplatte beimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Bei Plasmid-tragenden Stämmen mit Antibiotikaresistenzen wurde das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. 500 ml vorgewärmtes BHIS-Medium wurde mit 10 ml der Vorkultur inokuliert und bei 30 °C und 100 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 1,75 inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (15 min, 3500 g, 4°C). Danach wurden die Zellen zwei Mal mit 20 ml TG-Puffer (1 mM TRIS, 10 % (v/v) Glycerin, pH 7,5) sowie zwei Mal mit 10 %igem (v/v) Glycerin gewaschen und anschließend in 1 ml 10 %igem (v/v) Glycerin aufgenommen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die kompetenten Zellen in 150 µl-Aliquots bei -80 °C aufbewahrt.

Zur Elektroporation wurden 150 µl Zellen mit 1-2 µl der zu transformierenden DNA gemischt und luftblasenfrei in eine vorgekühlte, sterile Elektroporationsküvette (Typ Gene Pulser Cuvette, 0,2 cm, Biorad, Hercules, USA) überführt. Die Elektroporation wurde dann mit einem Puls bei einer Spannung von 2,5 kV, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kondensatorkapazität von 25 µF in einem BIORAD GENE PULSER XCELL™ (Biorad, Hercules, USA) durchgeführt. Sofort nach Beendigung des elektrischen Pulses wurde die Zellsuspension in 4 ml BHIS-Medium aufgenommen, 6 min bei 46 °C inkubiert, 1 h bei 30 °C regeneriert und auf Antibiotika-haltigen BHIS-Agarplatten ausplattiert.

2.5.5 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion

Definierte DNA-Fragmente wurden sowohl für analytische (Kontrolle von Transformanden und Deletionsmutanten, 2.5.5.2) als auch für präparative Zwecke (*in vitro*-Amplifikation von DNA-Fragmenten, 2.5.5.1) mittels der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) amplifiziert (Mullis & Faloona, 1987). Falls im Text nicht anders vermerkt, wurde für präparative PCR-Ansätze die KOD Hot Start DNA Polymerase (Merck, Darmstadt) und für analytische PCR-Ansätze die Taq-DNA-Polymerase (DreamTaq™ PCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Die Reaktionen wurden in einem T3000 Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen für die PCR wurden entsprechend den Angaben des Herstellers gewählt. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) synthetisiert.

2.5.5.1 *In vitro*-Amplifikation von DNA-Fragmenten

Zur *in vitro*-Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden die Reaktionen in einem Volumen von 50 µl angesetzt. In den Ansätzen enthalten waren 0,1-0,75 µg Matrizen-DNA, je 300 nM Oligonukleotide, 0,02 U KOD Hot Start DNA Polymerase, 5 µl PCR Puffer, 1,5 mM MgSO₄ sowie je 200 µM dATP, dGTP, dCTP und dTTP. Das PCR-Programm bestand aus

einem einmaligen Denaturierungsschritt von 2 min bei 95 °C und einem sich wiederholenden Zyklus aus DNA-Denaturierung für 20 s bei 95 °C, Primeranlagerung (*annealing*) für 10 s bei 55–65 °C und Verlängerung (Elongation) der Primer mithilfe der DNA-Polymerase für 15-20 s/ kb bei 70 °C. Abschließend wurde eine finale Elongation für 5 min bei 70 °C durchgeführt. Die Anlagerungs-Temperatur für die Oligonukleotide wurde üblicherweise 5 °C unter der Schmelztemperatur (T_m) der Oligonukleotide gewählt. Die Schmelztemperatur der Oligonukleotide kann mithilfe der Formel $T_m [^{\circ}\text{C}] = [(G + C) \cdot 4] + [(A + T) \cdot 2]$ abgeschätzt werden (Sambrook & Russell, 2001). Der Erfolg der PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.5.5.2 Kolonie-PCR

Zur Kontrolle von *E. coli*-Transformanden oder *C. glutamicum*-Deletionsmutanten wurden einzelne Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher in 50 µl sterilem Wasser resuspendiert und die Suspension für 10 min bei 95 °C inkubiert, um die Zellen aufzuschließen. Der am Zahnstocher verbliebene Rest der Zellen wurde auf einer frischen LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Für die PCR wurde der DreamTaqTM PCR Master Mix verwendet, der bereits Puffer, dNTPs und MgCl₂ enthielt. Diesem wurden dann 2 µl der Zellsuspension sowie je 400 nM Oligonukleotide hinzugefügt. Das PCR-Programm bestand aus einem einmaligen Denaturierungsschritt von 2 min bei 95 °C und einem sich wiederholenden Zyklus aus DNA-Denaturierung für 30 s bei 95 °C, Primeranlagerung (*annealing*) für 30 s bei 55–65 °C und Verlängerung (Elongation) der Primer mithilfe der DNA-Polymerase für 1 min/ kb bei 72 °C. Abschließend wurde eine finale Elongation für 10 min bei 72 °C durchgeführt. Die Berechnung der Anlagerungs-Temperatur und der Elongationszeit erfolgte wie unter 2.5.5.1 beschrieben.

2.5.6 Konstruktion von Deletionsmutanten

Zur Konstruktion von *C. glutamicum*-Deletionsmutanten wurde das Ziel-Gen im Leseraster deletiert (Niebisch & Bott, 2001). Zu diesem Zweck wurde zunächst eine *overlap extension*-PCR durchgeführt (Link *et al.*, 1997). In einer ersten PCR wurden zunächst zwei etwa 500 bp große stromabwärts und stromaufwärts liegende, flankierende DNA-Bereiche des zu deletierenden Gens getrennt amplifiziert. Die dazu verwendeten inneren Oligonukleotide wurden so modifiziert, dass die entstandenen PCR-Fragmente eine 21 bp lange komplementäre *linker*-Sequenz aufwiesen. Für die *overlap extension*-PCR wurden die Fragmente aus der ersten PCR als DNA-Matrize verwendet, sodass über den komplementären Bereich während der Reaktion eine Anlagerung stattfinden konnte. Durch den Einsatz der äußeren Oligonukleotide wurde so ein Fusionsprodukt erhalten. Diese Deletionskassette wurde anschließend in den Vektor pK19*mobsacB* kloniert (Schäfer *et al.*, 1994). pK19*mobsacB* wird in *C. glutamicum* nicht repliziert, sondern kann durch homologe Rekombination in das Chromosom integriert werden. Nach der Transformation des Vektors wurden kanamycinresistente Klone isoliert, die das Plasmid ins Chromosom integriert hatten. Durch die Kultivierung dieser Klone in Vollmedium ohne Antibiotikum konnte ein zweites Rekombinationseignis stattfinden. Die Bakterienkultur wurde in verschiedenen Verdünnungen auf LB-Medium mit 10 % (w/v) Saccharose ausplattiert. Der Vektor pK19*mobsacB* trägt das *sacB*-Gen, welches für die Levansucrase kodiert. Dieses Enzym spaltet Saccharose in Glukose und Fruktose und setzt Fruktose gleichzeitig zum

oligomeren Levan um. Dieses Polymer führt zur Letalität (Jäger *et al.*, 1992), sodass nur solche Klone wachsen, die das Plasmid durch das zweite Rekombinationsereignis wieder verloren hatten. Bei den so erhaltenen saccharoseresistenten und kanamycinsensitiven Klonen war entweder die Wildtyp-Situation wiederhergestellt oder das Ziel-Gen deletiert. Durch eine PCR mit Oligonukleotiden, die in einem Bereich außerhalb der Deletionskassette im Genom binden, konnten Klone mit Deletion identifiziert werden.

2.5.7 DNA-Sequenzanalyse

DNA-Sequenzierungen wurden nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) bei der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) durchgeführt. Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden mit dem Programm *Clone Manager 9 Professional Edition* (Version 9.1, Scientific & Educational Software) analysiert.

2.6 Quantitative Bestimmung von Aminosäuren

2.6.1 Konzentrationsbestimmung von Aminosäuren mittels HPLC-MS

Die Quantifizierung von Aminosäuren wurde mithilfe von *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) gekoppelt mit Massenspektrometrie (MS) durchgeführt. Die chromatographische Trennung der Aminosäuren erfolgte mittels Kationenaustauschchromatographie mit dem uHPLC 1290 Infinity System der Firma Agilent (Santa Clara, USA). Als Säule fand eine Luna 5 μ SCX 100 Å, 150 mm \times 2,0 mm (Phenomenex, Torrance, USA) mit vorgeschalteter Vorsäule (SecurityGuard™, Phenomenex, Torrance, USA) Verwendung. Als Laufmittel wurden 5 % (v/v) Essigsäure und 15 mM Ammoniumacetat (pH 6) verwendet. Es wurde je 1 μ l Probe injiziert. Die Aminosäuren wurden mittels zwei aufeinanderfolgenden isokratischen Elutionsschritten bei einem Laufmittelfluss von 0,4 ml/min von der auf 30 °C geheizten Säule eluiert (Programm s. Tab. 2.4). Die Detektion der Aminosäuren erfolgte mit dem 6130 Quadrupol LC/MS System der Firma Agilent (Santa Clara, USA). Das Massenspektrometer wurde im positiven ESI-Modus verwendet. Die Datenerfassung wurde im *selected ion monitoring*-Modus mit folgenden Parametern durchgeführt: Temperatur des Trockengases (N₂) von 250 °C bei einer Flussrate von 12 l/min, Zerstäuberdruck von 35 psig, Kapillarspannung von 2 kV, Temperatur des Verdampfers von 200 °C sowie Fragmentorspannung von 55 eV. Die Konzentration der analysierten Aminosäure wurde über den Vergleich mit einem externen Standard der betreffenden Aminosäure und unter zusätzlicher Verwendung von L-Asparagin als internem Standard ermittelt. Die Datenauswertung erfolgte mit dem Programm *ChemStation* (Agilent, Santa Clara, USA).

Tab. 2.4: Elutionsprofil zur chromatographischen Auftrennung von Aminosäuren.

Zeit [min]	5 % Essigsäure [%]	15 mM Ammoniumacetat [%]
0	85	15
11	85	15
17	0	100
35	0	100
35,1	85	15

2.6.2 Bestimmung intrazellulärer Aminosäurekonzentrationen

Zur Bestimmung intrazellulärer Aminosäurekonzentrationen wurde die Methode der Silikonölzentrifugation angewendet (Klingenberg & Pfaff, 1967). Bei dieser Methode kommt es zu einer schnellen Inaktivierung des Zellstoffwechsels sowie der raschen Abtrennung der Zellen vom Kulturüberstand. Hierfür wurden 400 µl Beckman-Reaktionsgefäße (Beckman Instruments GmbH, München) mit 30 µl 20 %iger (v/v) Perchlorsäure und 65 µl Silikonöl mit einer Dichte von 1,04 g/cm³ befüllt. Das Silikonöl wurde durch das Mischen von Silikonölen mit einer Dichte von 1,03 g/cm³ (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe) und 1,05 g/cm³ (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen) hergestellt. Pro Messpunkt wurden 3 x 100 µl Zellsuspension in je drei vorbereitete Beckman-Reaktionsgefäße überführt. Durch sofortige Zentrifugation für 45 s bei maximaler Geschwindigkeit (12,535 g) in einer Microfuge E (Beckman Instruments GmbH, München) wurden die Zellen vom Medium getrennt, welches aufgrund seiner geringen Dichte als Überstand auf der Silikonölphase zurückblieb. Die so erhaltenen Kulturüberstände wurden zur Quantifizierung der extrazellulären Aminosäurekonzentration mittels HPLC-MS vermessen. Im Gegensatz dazu mussten zur Quantifizierung der intrazellulären Aminosäuren zunächst die in der Perchlorsäurephase pelletierten Zellen aufgeschlossen werden (Hoischen & Krämer, 1990). Für den Zellaufschluss wurde das Pellet in 45 µl H₂O und 10 µl Silikonöl mit einer Dichte von 1,07 g/cm³ (Dow Corning GmbH, Wiesbaden) resuspendiert, anschließend für 5 min im Ultraschallbad (Branson, Heusenstamm) inkubiert und die erhaltene Suspension anschließend mit 25 µl 5 M KOH, 1 M Triethanolamin neutralisiert. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgetrennt (4 °C, 5 min, 16000 g) und der Überstand zur Quantifizierung der Aminosäuren mittels HPLC-MS verwendet. Die Berechnung der intrazellulären Aminosäurekonzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$c_{int} = \frac{(c_{int.gem.} \times 100) - (c_{ex} \times 0,0599 \times OD_{600})}{0,04 \times OD_{600}}$$

c_{int} :	errechnete intrazelluläre Aminosäurekonzentration [mM]
$c_{int.gem.}$:	gemessene intrazelluläre Aminosäurekonzentration [mM]
c_{ex} :	gemessene extrazelluläre Aminosäurekonzentration [mM]
OD_{600} :	Zelldichte während der Kurzzeitfermentation

Mithilfe dieser Formel erfolgte die Berechnung der tatsächlichen intrazellulären Konzentration unter Berücksichtigung (i) der bei der Aufarbeitung des Zellpellets durchgeführten Verdünnungsschritte ($c_{int.gem.} \times 100$), (ii) eines Korrekturfaktors, der den Fehler einbezieht, der durch die Aminosäurekonzentration im an den Zellen anhaftenden Medium bedingt ist ($c_{ex} \times 0,0599 \times OD_{600}$) und (iii) des intrazellulären Volumens der eingesetzten Zellen ($0,04 \times OD_{600}$). Der Multiplikationsfaktor ergibt sich daraus, dass eine OD_{600} von 1 einem Zelltrockengewicht von 0,3 mg/ml entspricht (Gutmann, 1993) und das Zellvolumen von *C. glutamicum* 1,6 µl/mg Trockengewicht beträgt (Zittrich & Krämer, 1994).

2.7 Biochemische Methoden

2.7.1 Zellaufschluss mit Ultraschall

Für den Zellaufschluss wurden 100 ml Kultur in 1 ml Lysispuffer (50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8 mit NaOH eingestellt) resuspendiert und anschließend in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen in einem Eisbad mit Ultraschall behandelt. Zellsuspensionen mit *E. coli* wurden für 4 min mit einer Pulslänge von 20 % und einer Beschallintensität von 2 mit dem Ultraschalldesintegrator (Branson Sonifier W-250, Branson Sonic Power Company, Danbury, USA) behandelt. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (30 min, 16000 g, 4 °C) abgetrennt und der Überstand als Rohextrakt in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.7.2 Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Agarose

Proteine mit Polyhistidin-Tag wurden über an Agarose gebundene Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) gereinigt (Hochuli *et al.*, 1987). Hierzu wurden Säulen mit einem Bettvolumen von 200 µl-1 ml Ni-NTA-Agarose (QIAGEN, Hilden) vorbereitet und mit 2 x 5 Säulenvolumen Lysispuffer äquilibriert. Anschließend wurde der komplette Rohextrakt zwei Mal auf die Säule geladen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen mit 10 Säulenvolumen Waschpuffer-20 (wie Lysispuffer, aber mit 20 mM Imidazol), 10 Säulenvolumen Waschpuffer-30 (wie Lysispuffer, aber mit 30 mM Imidazol) und 10 Säulenvolumen Waschpuffer-60 (wie Lysispuffer, aber mit 60 mM Imidazol) entfernt. Die Elution erfolgte mit 5 x 1 Säulenvolumen Elutionspuffer (wie Lysispuffer, aber mit 250 mM Imidazol). Die Elutionsfraktionen wurden auf Eis aufbewahrt. Mittels SDS-PAGE (2.7.3) wurde die Reinigung kontrolliert.

2.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde zur Trennung löslicher Proteine nach ihrer Masse verwendet (Laemmli, 1970; Lewis *et al.*, 1970). Die Trennung erfolgte in 12 %igen Bis-Tris-Polyacrylamidgelen in vertikalen Gelkammern (NuPAGE System, Life Technologies, Carlsbad, USA). Als Laufpuffer wurde ein MOPS-Puffer (50 mM MOPS, 50 mM TRIS, 1 mM EDTA, 0,1 % (w/v) SDS, pH 7,7) verwendet. Vor dem Auftrag wurden die Proben mit SDS-Ladepuffer versetzt (6x: 350 mM TRIS, 10 % (w/v) SDS, 60 mM DTT, 30 % (v/v) Glycerin, 0,175 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8) und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Zur Abschätzung der Proteingröße diente der Marker PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Die Trennung wurde bei konstanter Stromstärke (0,02 A pro Gel) und einer maximalen Spannung von 200 V durchgeführt. Die Proteine wurden mithilfe des kolloidalen Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt. Dazu wurden die Gele zunächst mit H_2O gewaschen, mit der Färbelösung (0,1 % (w/v) Coomassie brilliant blue G-250, 40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure) bedeckt, 1 min bei maximaler Stärke in der Mikrowelle erhitzt und dann 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde mithilfe von Entfärbelösung (10 % (v/v) Ethanol, 7,5 % (v/v) Essigsäure) entfernt. Dazu wurden die Gele mit Entfärbelösung bedeckt, 1 min bei maximaler Stärke in der Mikrowelle erhitzt und anschließend 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis der Hintergrund frei von Farbstoff war.

2.7.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch (Bradford, 1976). Dieser Methode liegt zugrunde, dass sich der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau an Proteine anlagert und es somit zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 466 nm zu 595 nm kommt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist proportional zur Proteinkonzentration in der Lösung. Für die Messung wurde 33 µl Probe zu 1 ml Bradford-Reagenz (0,01 % (w/v) Coomassie brilliant blue G-250, 4,7 % (w/v) 95 % Ethanol, 8,5 % (w/v) 85 % Phosphorsäure) gegeben, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Konzentration wurde über eine mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standard erstellte Eichkurve ermittelt.

2.7.5 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Um die Identität der isolierten Proteine zu überprüfen, wurden diese mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert (Schaffer *et al.*, 2001). Zu diesem Zweck wurden die mit Coomassie-gefärbten Proteinbanden aus den Polyacrylamidgelen ausgeschnitten und zwei Mal mit 750 µl 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat in 30 % (v/v) Acetonitril gewaschen. Anschließend wurden die Gelstücke für 20 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 6 µl 3 mM TRIS/HCl (pH 8,8) mit 10 ng/µl Trypsin rehydratisiert. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden weitere 6 µl 3 mM TRIS/HCl (pH 8,8) hinzugegeben und die Proben über Nacht bei Raumtemperatur verdaut. Die Peptide wurden durch Zugabe von 10 µl H₂O, 15 min Inkubation bei Raumtemperatur, Zugabe von 10 µl 0,2 % (v/v) Trifluoressigsäure in 30 % (v/v) Acetonitril und 10 min Inkubation bei Raumtemperatur eluiert. Im Anschluss wurden die Peptide mithilfe einer Mikrochromatographiesäule „ZipTip® C₁₈ standard bed“ (Millipore, Schwalbach) nach Angaben des Herstellers gereinigt und konzentriert, mit 3 µl gesättigter Matrixlösung (α-Cyano-4-hydroxymethylsäure in 50 % (v/v) Acetonitril/0,25 % (v/v) Trifluoressigsäure) eluiert und auf die Probenplatte „Prespotted AnchorChip“ (Bruker Daltonics, Bremen) aufgetragen. Die anschließende Analyse erfolgte mit einem Ultraflex III MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen) im positiven Reflektor-Modus. Die Steuerung des Geräts erfolgte mithilfe der mitgelieferten Software *FlexControl*. Die erhaltenen Peptidmassen wurden mittels des Programms BioTools 3.1, des MASCOT-Servers (Matrix Science, London, UK) und der MASCOT-Software (Perkins *et al.*, 1999) mit einer lokalen Datenbank verglichen. Beim Peptidmassenvergleich wurden ein *missed cleavage* beim Trypsinverdau, eine Carbamidomethylsubstitution am L-Cystein als feste Modifikation, eine Oxidation von L-Methionin sowie Phosphorylierungen von L-Serin- und L-Threoninresten als variable Modifikation und eine Abweichung von 200 ppm zugelassen. Von einer sicheren Identifizierung wurde ausgegangen, wenn ein MOWSE-Score (*molecular weight search*) ≥ 50 erhalten wurde (Pappin *et al.*, 1993).

2.8 Spektroskopische Analysen

2.8.1 Epifluoreszenzmessung

Zur Durchführung von Epifluoreszenzmessungen wurde das inverse Mikroskop Nikon Eclipse Ti (Nikon GmbH, Düsseldorf) eingesetzt, welches mit folgendem Zubehör ausgestattet war: Fokus Assistent (Nikon PFS, Nikon GmbH, Düsseldorf), Apo TIRF 100× Oil

DIC N Objektiv, NIKON DS-Vi1 color Kamera, ANDOR LUCA R DL604 Kamera, Xenon Fluoreszenz-Lichtquelle und Standard Filter für EYFP-Detektion (Exzitation: 490 - 510 nm, Emission: 520 - 550 nm). Sowohl Differential-Interferenz-Kontrast-Aufnahmen (*differential interference contrast*, DIC), als auch Fluoreszenz-Aufnahmen wurden mithilfe des Software-Pakets *Nikon NIS Elements AR* (Nikon GmbH, Düsseldorf) aufgenommen und analysiert. Die zu analysierenden Zellen wurden vor den mikroskopischen Aufnahmen auf Objektträgern mit 1 % (w/v) Agarose fixiert.

2.8.2 Fluoreszenzmessungen

Für die Fluoreszenzmessungen mit zirkulär permutiertem GFP (cpGFP) wurde das Mikrotiterplatten-Lesegerät infinite M200pro (Tecan, Männedorf, Schweiz) verwendet. Als Puffer sowohl für Zellsuspensionen als auch für gereinigtes Protein diente Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS; 154 mM NaCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,9 mM NaH₂PO₄, pH 7,4). Zur Aufnahme von Exzitationsspektren wurde die Emissionswellenlänge bei 525 nm gehalten und der Exzitationsscan über einen Wellenlängenbereich von 350 bis 505 nm aufgenommen. Für das dazugehörige Emissionsspektrum wurde die Exzitationswellenlänge bei 460 nm gehalten und der Emissionsscan über einen Wellenlängenbereich von 480 bis 600 nm aufgenommen. Für Einzelpunktmessungen wurde die Excitation bei 480 nm und die Emission bei 510 nm gemessen.

3 Ergebnisse

3.1 Konstruktion eines plasmidfreien L-Serin-Produktionsstammes

Der L-Serin-Produktionsstamm *C. glutamicum* Ser4 ist durch zwei chromosomale Deletionen gekennzeichnet. Die Deletion des Gens *sdaA*, welches für die Serin-Dehydratase kodiert, führt zur Reduktion des L-Serin-Abbaus durch die Zelle. Die Deletion der Gene *pabABC* führt zur Folsäure-Auxotrophie und erlaubt die Aktivitätskontrolle der Folsäure-abhängigen Serin-Hydroxymethyltransferase. Weiterhin enthält der Stamm das Plasmid *pserACB* zur Überexpression der Gene *serA^{fbr}*, *serC* und *serB* (Stolz *et al.*, 2007). Es sollte ein Stammhintergrund geschaffen werden, um auch plasmidfrei L-Serin bilden zu können, damit bei den molekulargenetischen Arbeiten zur L-Cystein-Bildung aus L-Serin verschiedenste Plasmide eingesetzt werden können. Im Plasmid *pserACB* kodiert *serA^{fbr}* für eine feedbackresistente 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase. Die Feedback-Resistenz beruht dabei auf der Deletion der letzten 197 Aminosäuren des Proteins (Peters-Wendisch *et al.*, 2002). Es war deswegen das Ziel, diese Deletion im chromosomal kodierten *serA*-Gen einzuführen. Vorerst mussten jedoch die Randbereiche der verkürzten *serA^{fbr}*-Variante mittels Sequenzierung überprüft werden, da es Hinweise gab, dass die durch P. Peters-Wendisch erstellte *in silico*-Sequenz der Plasmide *pserACB* und *pZ1serAΔ197*, aus dem die Originalsequenz stammt, mit der tatsächlichen nicht übereinstimmt. Die Sequenzierung der Plasmide *pserACB* und *pZ1serAΔ197* von P. Peters-Wendisch ergab, dass zwar die letzten 591 bp des *serA*-Gens deletiert waren, aber der *open reading frame* von *serA* nach der Deletion noch um 30 bp verlängert in *pserACB* vorliegt. Dies entspricht dem um 197 Aminosäuren am C-terminalen Ende deletierten SerA plus den 10 zusätzlichen Aminosäuren GTELELLRRR.

3.1.1 Chromosomale Integration des Gens für die feedbackresistente 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase

Um auszuschließen, dass die 10 zusätzlichen Aminosäuren einen Einfluss auf die Stabilität bzw. Aktivität von SerAΔ197 haben, sollte ein Nachbau ohne die zehn zusätzlichen Codons erstellt und chromosomal im Serinstammhintergrund integriert werden (SerAΔ197^{stp}). Zusätzlich sollte auch die SerAΔ197-Variante mit den zehn zusätzlichen Codons (SerAΔ197) chromosomal integriert werden. Zu diesem Zweck wurden zwei Deletionsplasmide konstruiert: *pK19mobsacB_serAΔ197* mit der Fusion GTELELLRRR und *pK19mobsacB_serAΔ197^{stp}*. Die erhaltenen Deletionsmutanten *C. glutamicum* Δ*sdaA*Δ*pabABC serAΔ197* sowie *C. glutamicum* Δ*sdaA*Δ*pabABCserAΔ197^{stp}* werden im Folgenden Ser4-1 bzw. Ser4-2 genannt. Die beiden Stämme Ser4-1 und Ser4-2 sollten auf die L-Serin-Bildung untersucht werden. Weiterhin sollte auch die L-Cystein-Bildung dieser Stämme untersucht werden, da möglicherweise schon geringe Mengen an gebildetem L-Serin ausreichen, damit L-Cystein von den Zellen überproduziert und exportiert wird. Hierzu wurde ein Expressionsplasmid mit den L-Cystein-Synthese-Genen *cysE* und *cysK* konstruiert (zur Konstruktion s. Abschnitt 3.2.1). Die Stämme Ser4-1 und Ser4-2 wurden mit dem resultierenden Plasmid *pcysKE* sowie dem Leervektor *pKEEx2* transformiert. Als weitere Kontrolle diente der Stamm *C. glutamicum* Δ*sdaA*Δ*pabABC*. Die Stämme wurden

über Nacht in CGIII-Medium kultiviert und nach 16 h eine zweite Vorkultur in CGXII-Medium inokuliert. Nach Kultivierung für etwa 9 h wurde die Hauptkultur in CGXII mit Folsäure inokuliert. Wie bereits in den Arbeiten von M. Stolz gezeigt werden konnte, führt die Supplementation des Folsäure-*auxotrophen* Stammes Ser4 mit unterschiedlichen Folsäure-Konzentrationen zu unterschiedlichen Aktivitäten der Serin-Hydroxymethyltransferase, was einen direkten Einfluss auf die L-Serin-Ausbeute hat (Stolz *et al.*, 2007). Aus diesem Grund wurden die Hauptkulturen mit 0,5 mM Folsäure supplementiert und das Wachstum sowie die Bildung von L-Serin und L-Cystein mittels HPLC-MS bestimmt. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt. Abbildung 3.1 zeigt Mittelwerte und Standardabweichung der Versuche.

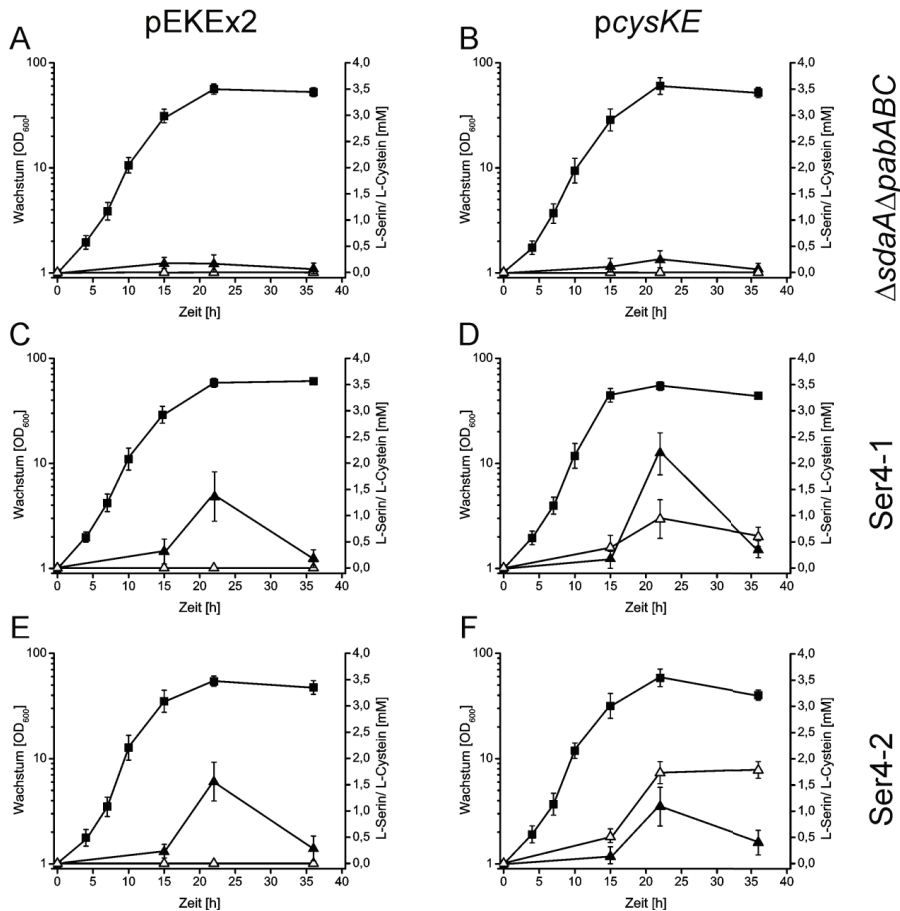


Abb. 3.1: Bildung von L-Serin und L-Cystein mit *C. glutamicum* Ser4-1 und Ser4-2. Dargestellt sind das Wachstum und die Konzentrationen an L-Serin und L-Cystein im Kulturüberstand. A, C, E: Kulturen mit Leervektor pEKEx2; B, D, F: Kulturen mit Expressionsvektor *pcysKE*; A+B: *C. glutamicum* $\Delta sdaA\Delta pabABC$; C+D: *C. glutamicum* Ser4-1; E+F: *C. glutamicum* Ser4-2. Wachstum (■), L-Serin (▲), L-Cystein (Δ).

Der Kontrollstamm $\Delta sdaA\Delta pabABC$ zeigte sowohl mit Leerplasmid als auch mit Expressionsvektor nur sehr geringe L-Serin-Bildung im Bereich von 0,15 bis 0,25 mM und keine L-Cystein-Bildung. (Abb. 3.1 A+B). Im Gegensatz dazu zeigten die Stämme Ser4-1 und Ser4-2 mit Leerplasmid eine leicht erhöhte intermediäre L-Serin-Bildung von $1,3 \pm 0,5$ mM bzw. $1,5 \pm 0,3$ mM (Abb. 3.1 C+E). Mit dem Ser4 Stamm, der $serA^{fbr}$ plasmidkodiert enthält, wurden aber 40 mM L-Serin erhalten (Daten nicht gezeigt). Bei Expression der L-Cystein-Synthese-Gene *cysE* und *cysK* zeigten interessanterweise sowohl Ser4-1 als auch Ser-2 bereits L-Cystein-Bildung. Ser4-1 akkumulierte $2,2 \pm 0,35$ mM L-Serin und $0,9 \pm 0,3$ mM L-Cystein (Abb. 3.1 D), wohingegen Ser4-2 $1,1 \pm 0,35$ mM L-Serin und $1,75 \pm 0,15$ mM L-Cystein bildete (Abb. 3.1 F). Bei allen Stämmen kam es zum Ende der Kultivierung zu einer Reduktion der L-Serin-Konzentration im Überstand, die auf eine Verstoffwechselung von ausgeschiedenem L-Serin hinweist. Der Austausch der nativen 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase durch eine der zwei feedbackresistenten Varianten führte somit zur Bildung von L-Serin. Möglicherweise gibt es geringe Unterschiede mit den zwei $SerA\Delta 197$ -Varianten bezüglich der Produktbildung, die aber bei den geringen Konzentrationen nicht überbewertet werden dürfen. Bei zusätzlicher Expression der L-Cystein-Synthese-Gene kommt es bereits zur Bildung und Ausscheidung von L-Cystein. Für die Bildung von größeren Mengen an L-Serin, so wie sie bei der Nutzung des plasmidkodierten $serA^{fbr}$ in Plasmid *pserACB* typisch sind, reicht der chromosomale Austausch der nativen 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase durch eine feedbackresistente Variante jedoch nicht aus.

3.1.2 Promotoraustausch der C-terminal verkürzten 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase im Chromosom durch einen starken konstitutiven Promotor

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, führte der Austausch der nativen 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase durch feedbackresistente Varianten zur Bildung geringer L-Serin-Konzentrationen. Die Expressionsstärke des nativen *serA*-Promotors reichte möglicherweise nicht aus, um eine erhöhte L-Serin-Bildung und die erhoffte starke L-Cystein-Bildung zu erlangen. Aus diesem Grund sollte der Austausch des nativen Promotors vor $serA\Delta 197^{stp}$ durch einen starken konstitutiven Promotor erfolgen. Hierfür wurde der Promotor des Elongationsfaktors TU (P_{tuf}) aus *C. glutamicum* verwendet, welcher bereits erfolgreich für diesen Zweck benutzt worden war (Becker *et al.*, 2005; Litsanov *et al.*, 2012). Für den Austausch wurde das Plasmid *pK19mobsacBP_{tuf}serA Δ 197^{stp}* konstruiert. Der im Screening erhaltene Stamm *C. glutamicum* $\Delta sdaA\Delta pabABC P_{tuf}serA\Delta 197^{stp}$ wurde mittels Sequenzierung überprüft und wird im Folgenden Ser4-3 genannt. Als Kontrolle wurde der Stamm Ser4-2 verwendet. Die beiden Stämme Ser4-2 und Ser4-3 wurden zusätzlich noch mit dem Plasmid *pEC-T18mob2serCB* (Peters-Wendisch *et al.*, 2005) transformiert, um zu untersuchen, ob für eine ausreichende Akkumulierung von L-Serin auch noch die Gene *serC* und *serB* notwendig sind. Daten dazu liegen von M. Stolz und P. Peters-Wendisch nicht vor. Als weitere Kontrolle wurden die Stämme mit dem Plasmid *pZ1serA Δ 197^{stp}* transformiert. Die Stämme wurden wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben kultiviert und das Wachstum sowie die L-Serin-Bildung mittels HPLC-MS aufgenommen. Der Versuch wurde mit zwei verschiedenen Klonen von Ser4-3 aus dem Screening durchgeführt. Da sich die Klone bezüglich des Wachstums und der L-

Serin-Bildung kaum unterschieden, zeigt Abb. 3.2 exemplarisch die Ergebnisse für einen der beiden Klone.

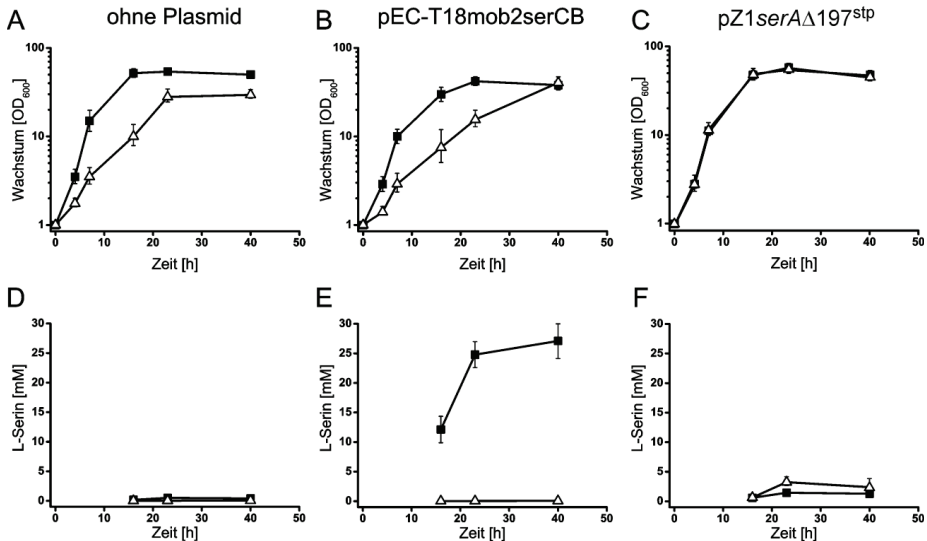


Abb. 3.2: Wachstum und L-Serin-Bildung der Stämme *C. glutamicum* Ser4-2 und Ser4-3. Dargestellt ist das Wachstum in CGXII und die L-Serin-Bildung über die Zeit. A: Wachstum der Stämme ohne Plasmid, B: Wachstum der Stämme mit pEC-T18mob2serCB, C: Wachstum der Stämme mit pZ1serAΔ197^{stp}, D: L-Serin-Bildung der Stämme ohne Plasmid, E: L-Serin-Bildung der Stämme mit pEC-T18mob2serCB, F: L-Serin-Bildung der Stämme mit pZ1serAΔ197^{stp}, *C. glutamicum* Ser4-2 (■), *C. glutamicum* Ser4-3 (△).

Ohne Plasmid zeigte die Promotoraustauschmutante Ser4-3 ein deutlich verringertes Wachstum im Vergleich zum Ausgleichsstamm Ser4-2. Derselbe Phänotyp zeigte sich auch nach Einbringen des Plasmids pEC-T18mob2serCB. Durch plasmidbasierte Expression von *serA*Δ197^{stp} konnte jedoch das Wachstumsverhalten des Ausgangsstamms Ser4-2 wiederhergestellt werden. In Bezug auf die L-Serin-Bildung zeigte sich, dass der Stamm Ser4-3 ohne Plasmid nur $0,06 \pm 0,03$ mM L-Serin bildete und damit weniger als der Ausgangsstamm Ser4-2, der $0,42 \pm 0,07$ mM L-Serin akkumulierte. In Anwesenheit von pZ1serAΔ197^{stp} waren die L-Serin-Mengen in den Stämmen Ser4-2 und Ser4-3 mit $1,28 \pm 0,31$ und $2,51 \pm 1,41$ mM leicht erhöht. Deutlich höhere Konzentrationen von $27,1 \pm 3,0$ mM wurden dagegen mit Ser4-2 pEC-T18mob2serCB erreicht. In dem durchgeführten Experiment sind die Folgen der P_{tuf} -Verwendung unverständlich. Es könnte sein, dass durch die Integration des neuen Promotorbereichs die Expression von *serA* gestört wird. Die Untersuchung der Expression ausgehend von P_{serA} und P_{tuf} könnte weiteren Aufschluss geben. Möglicherweise ist es sinnvoller, über Punktmutationen im Promotor von *serA* eine verstärkte Expression zu erreichen. Bezüglich der Frage, ob chromosomal kodiertes, feedbackresistentes *serA* allein zu erhöhter L-Serin-Bildung führt, zeigt das Experiment mit Ser4-2 pEC-T18mob2serCB, dass auch die Expression von *serC* und *serB* in Kombination mit *serA*^{fbr} für eine erhöhte L-Serin-Bildung bestimmend sind. Dementsprechend müsste die ganze Kasette aus dem Plasmid pserACB, welches im Ser4-

Stamm vorhanden ist, ins Genom eingebracht werden, oder die Promotoren vor den jeweiligen Genen ausgetauscht werden.

3.2 Steigerung der L-Cystein-Bildung mit *C. glutamicum*

3.2.1 Wachstum in Anwesenheit von L-Cystein

Zu Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, dass die Anwesenheit von L-Cystein im Kulturmedium eine hemmende Wirkung auf das Wachstum von *C. glutamicum* ATCC13032 (WT) hat (Follmann *et al.*, 2009). Da die Arbeiten zur Steigerung der L-Cystein-Synthese auf einem plasmidfreien L-Serin-Produzenten aufbauen sollten, dieser jedoch nur geringe Mengen L-Serin akkumulierte, wurde die Auswirkung von verschiedenen Konzentrationen an L-Cystein auf das Wachstum des Ausgangsstammes Ser4 vergleichend mit dem Wildtyp betrachtet. Die Kultivierung wurde wie in Abschnitt 3.1.1. beschrieben durchgeführt und das Wachstum der Hauptkulturen im BioLector verfolgt.

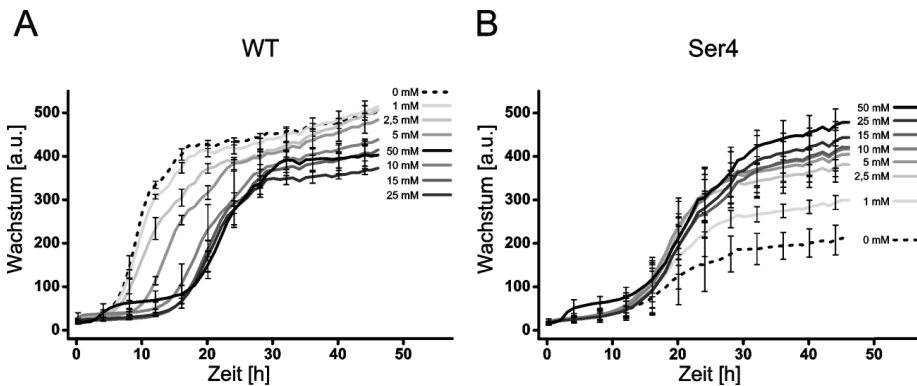


Abb. 3.3: Wachstum von *C. glutamicum* ATCC13032 (WT) und *C. glutamicum* Ser4 in Anwesenheit von L-Cystein. Dargestellt ist das Wachstum in CGXII mit verschiedenen Konzentrationen von L-Cystein über die Zeit. A: *C. glutamicum* ATCC13032 (WT); B: *C. glutamicum* Ser4; ---: 0 mM, —: 1 mM, —: 2,5 mM, —: 5 mM, —: 10 mM, —: 15 mM, —: 25 mM, —: 50 mM L-Cystein.

Das Wachstum des Wildtyps war bereits bei geringen Konzentrationen von L-Cystein im Medium verringert. Dabei zeigte sich sowohl eine Verminderung der Wachstumsrate als auch der maximalen Dichte der Kulturen. Ab einer Konzentration von 15 mM L-Cystein verschlechterte sich das Wachstum nicht weiter, was wahrscheinlich daran lag, dass L-Cystein zum schwer löslichen L-Cystin oxidierte und ausfiel. Das konnte sowohl visuell, als auch mittels LC-MS-Messungen des Überstands bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Bei der Konzentration von 100 mM L-Cystein (nicht in Abb. 3.3 gezeigt) war durch das ausgefallene L-Cystin das Signal des BioLectors stark gestört, sodass keine Wachstumskurve aufgezeichnet werden konnte. Dieser Effekt wurde bereits bei einer Konzentration von 50 mM sichtbar. Der L-Serin-Produzent Ser4 zeigte wie erwartet ohne Zugabe von L-Cystein ein vermindertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp, da die Kultivierung unter Folsäure-Mangel stattfand. Mit zunehmender Konzentration von L-Cystein war aber überraschenderweise eine Verbesserung des Wachstums zu beobachten.

Dies wurde in unabhängigen Experimenten bestätigt. Die Analyse des Kulturüberstands der Ser4-Kulturen mittels HPLC-MS nach 48 h ergab, dass die Konzentration von gebildetem L-Serin mit zunehmender L-Cystein-Konzentration im Medium abnahm (Abb. 3.4). Bei 1 mM L-Cystein war dieser Effekt noch minimal, während in Anwesenheit von 2,5 mM L-Cystein die L-Serin-Bildung von $32 \pm 2,72$ mM in der Kontrolle ohne L-Cystein drastisch auf $9,83 \pm 0,2$ mM vermindert war. Ab einer Konzentration von 5 mM L-Cystein und höher, lag die L-Serin-Konzentration im Überstand zwischen 2,4 und 3,5 mM. Da die Glukose in allen Fällen verbraucht war, resultiert das verbesserte Wachstum vermutlich aus der geringeren L-Serin-Bildung der Kulturen. Es ist denkbar, dass L-Cystein in unbekannter Weise die Verfügbarkeit von C1-Bausteinen erhöht. Dieses Experiment weist auf eine komplexe Beeinflussung des Ser4-Stammes durch extern zugegebenes L-Cystein hin. Hohe L-Cystein-Konzentrationen können zu einer vermehrten Reduktion von Eisen führen, welches in der Fenton-Reaktion mit H_2O_2 Hydroxylradikale entstehen lässt und dadurch oxidativen Stress auslösen (Park & Imlay, 2003). Die Verknüpfung von oxidativem Stress mit dem L-Cystein- und L-Methionin-Metabolismus, welche eng mit der L-Serin-Synthese verknüpft sind, konnte bereits gezeigt werden (Follmann *et al.*, 2009).

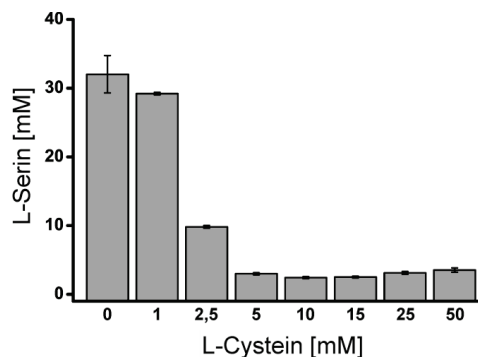


Abb. 3.4: L-Serin-Bildung von *C. glutamicum* Ser4 in Anwesenheit von L-Cystein. Dargestellt sind die über HPLC-MS ermittelten Konzentrationen an L-Serin im Überstand der Kulturen nach 48 h Kultivierung in CGXII-Medium. Es wurden jeweils drei biologische Replikate angefertigt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung.

3.2.2 Expression rekombinanter Serin-Acetyltransferasen

L-Cystein wird in zwei enzymatischen Schritten aus L-Serin synthetisiert. Für die fermentative Herstellung von L-Cystein ist der erste Schritt als der limitierende beschrieben (Wada & Takagi, 2006). Das diese Reaktion katalysierende Enzym, die Serin-Acetyltransferase (SAT, *cysE*), unterliegt sowohl in *E. coli* als auch *C. glutamicum* einer Feedback-Inhibierung durch L-Cystein. Die Inhibitorkonstante (K_i) für L-Cystein liegt für die SATs aus beiden Organismen im mikromolaren Bereich, und zwar bei $0,6 \mu\text{M}$ für *E. coli* und bei $2 \mu\text{M}$ für *C. glutamicum* (Haitani *et al.*, 2006; Kai *et al.*, 2006). Für *E. coli* wurden bereits feedbackresistente SAT-Varianten generiert (Kai *et al.*, 2006; Nakamori *et al.*, 1998) und zudem erfolgreich in *C. glutamicum* exprimiert (Wada *et al.*, 2002). Ein weiterer Ansatz für

die Umgehung der Feedback-Inhibierung ist die Verwendung von natürlich vorkommenden, feedbackresistenten SATs aus Pflanzen, da bereits gezeigt wurde, dass diese auch in *E. coli* funktional sind (Takagi *et al.*, 1999; Wirtz & Hell, 2003). Eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Serin-Acetyltransferasen findet sich in Tab. 3.1.

Tab. 3.1: Übersicht über in der Arbeit verwendeten Serin-Acetyltransferasen.

SAT	Organismus	K_i [μM]	Feedback-Resistenz	Literatur
CgSAT (<i>cysE</i>)	<i>C. glutamicum</i>	2	-	(Haitani <i>et al.</i> , 2006)
EcSAT^{wt}	<i>E. coli</i>	0,6	-	(Kai <i>et al.</i> , 2006)
EcSAT^{V95R,D96P}	<i>E. coli</i>	950	Aminosäureaustausch V95R, D96P	(Kai <i>et al.</i> , 2006)
NtSAT4	<i>N. tabacum</i>	keine Inhibierung	nativ	(Wirtz & Hell, 2003)

Für die heterologe Expression von SATs im Ser4-Stamm wurde die feedbackresistente Variante EcSAT^{V95R,D96P} aus *E. coli* ausgewählt, da diese von allen in der Literatur beschriebenen Mutanten am wenigsten *in vitro* durch L-Cystein gehemmt ist (Kai *et al.*, 2006). Zusätzlich sollte NtSAT4 aus *Nicotiana tabacum* exprimiert werden (Wirtz & Hell, 2003). Zum Vergleich diente die Wildtyp-Variante aus *E. coli*. Die drei Gene wurden in den Expressionsvektor pEKEx3 eingebracht und im Ser4-Stamm exprimiert. Die Kultivierung wurde wie in Abschnitt 3.1.1. beschrieben durchgeführt und das Wachstum sowie die Produktion von L-Serin und L-Cystein mittels HPLC-MS bestimmt. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt. Tab. 3.2 zeigt Mittelwerte und Standardabweichung der Versuche.

Tab. 3.2: Kultivierung des L-Serin-Stamms Ser4 mit verschiedenen Expressionsplasmiden. Dargestellt sind die Wachstumsraten sowie die gebildete Konzentration von L-Cystein und L-Serin nach 64 h.

Plasmid	Wachstumsrate [h ⁻¹]	L-Cystein [mM]	L-Serin [mM]
pEKEx3	0,091 ± 0,004	0,93 ± 0,16	63,1 ± 8,8
pEcSAT^{wt}	0,073 ± 0,008	1,02 ± 0,24	66,1 ± 7,0
pEcSAT^{V95R,D96P}	0,085 ± 0,004	1,39 ± 0,27	54,3 ± 5,7
pNtSAT4	0,087 ± 0,005	0,92 ± 0,16	72,7 ± 6,9

Der Ser4-Stamm bildet bereits ohne die Expression zusätzlicher L-Cystein-Synthese-Gene 0,93 ± 0,16 mM L-Cystein und 63,1 ± 8,8 mM L-Serin. Im Überstand der Kultur von Ser4 pEcSAT^{wt} wurden mit 1,02 ± 0,24 mM L-Cystein und 66,1 ± 7,0 mM L-Serin ähnliche Werte festgestellt, sodass von einer starken Feedback-Inhibierung ausgegangen werden kann und die erreichten L-Cystein-Werte auf der Aktivität der SAT aus *C. glutamicum* beruhen. Die Expression von EcSAT^{V95R,D96P} zeigte mit 1,39 ± 0,27 mM keinen signifikanten Effekt auf die L-Cystein-Bildung. Wada *et al.* (2002) konnte mit der Variante EcSAT^{M256I} im *C. glutamicum* Wildtyp 1 mM L-Cystein bilden, wohingegen bei Expression von EcSAT^{wt} weniger als

0,25 mM L-Cystein akkumuliert wurden. Da diese Variante jedoch mit einem K_i -Wert von 14,5 μ M schlechtere *in vitro*-Eigenschaften bezüglich der Feedback-Inhibition zeigte als EcSAT^{V95R,D96P} (Kai *et al.*, 2006), wurde sie nicht verwendet. Die Expression des Gens aus *N. tabacum* bewirkte keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Produktbildung im Vergleich zur Kontrolle. Da nicht bekannt ist, ob OASS aus *C. glutamicum* mit den heterologen SATs interagieren kann und in Pflanzen die Ausbildung des CS-Komplexes für die Aktivität von SAT entscheidend ist (Hell & Wirtz, 2011), ist es möglich, dass es zu keiner Interaktion kam. Dem wurde jedoch nicht weiter nachgegangen, da auch mit EcSAT^{V95R,D96P} nur ein mäßiger Erfolg zu verzeichnen war.

3.2.3 Expression von *cysE* und *cysK*

Die Expression heterologer SATs führte nicht zu einer deutlichen Verbesserung der Produktbildung. Aus diesem Grund sollten die homologen Gene *cysK* und *cysE* aus *C. glutamicum* plasmidbasiert exprimiert werden. Da bezüglich einer Ausbildung des CS-Komplexes in *C. glutamicum* keine Informationen vorlagen, wurden sowohl *cysE* einzeln als auch *cysK* und *cysE* gemeinsam in den Expressionsvektor pEKEx2 eingebracht und der Ser4-Stamm mit den entsprechenden Plasmiden transformiert. Die Kultivierung wurde wie in Abschnitt 3.1.1. beschrieben durchgeführt und das Wachstum sowie die Produktion von L-Serin und L-Cystein mittels HPLC-MS bestimmt. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt. Abb. 3.5 zeigt Mittelwerte und Standardabweichung der Versuche.

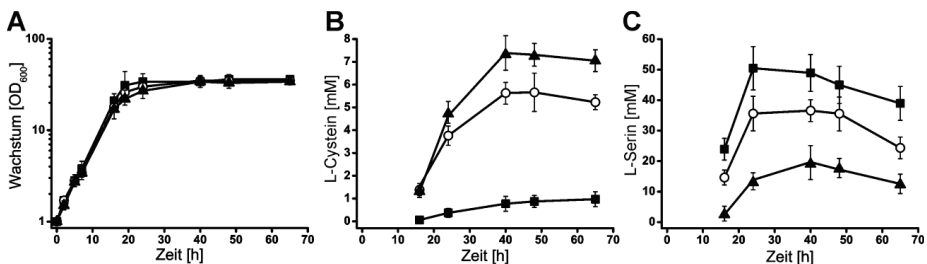


Abb. 3.5: Bildung von L-Cystein und L-Serin mit *C. glutamicum* Ser4 *pcysE* und *C. glutamicum* Ser4 *pcysKE*. Dargestellt ist das Wachstum in CGXII (A), sowie die Konzentration an L-Cystein (B) und L-Serin (C). ■: *C. glutamicum* Ser4 pEKEx2, ○: *C. glutamicum* Ser4 *pcysE*, ▲: *C. glutamicum* Ser4 *pcysKE*.

Wie zu erwarten, bildet Ser4 mit Leerplasmid bereits $0,95 \pm 0,35$ mM L-Cystein und $50,8 \pm 7,2$ mM L-Serin. Die Expression von *cysE* in diesem Stamm führte bereits zu einem starken Anstieg von L-Cystein im Überstand auf $5,6 \pm 0,8$ mM, bei gleichzeitiger Reduktion der L-Serin-Akkumulation auf $36,3 \pm 4,0$ mM. Die gleichzeitige Expression von *cysK* und *cysE* führte zu einer weiteren Steigerung der L-Cystein-Bildung auf $7,3 \pm 0,7$ mM. Die Bildung von L-Serin war in diesem Stamm stark reduziert und erreichte nur $18,8 \pm 4,9$ mM. Der negative Effekt auf die L-Serin-Bildung in Anwesenheit von L-Cystein, der bereits in Abschnitt 3.1.1 beschrieben wurde, war auch in diesem Experiment zu beobachten, allerdings gab es keinen fördernden auf das Wachstum. Das liegt möglicherweise daran, dass die Stämme wegen der assimilatorischen Sulfat-Reduktion mehr Energie für die Herstellung von L-Cystein benötigen. Erstaunlicherweise zeigte also die Expression von

C. glutamicum cysE einen deutlich positiveren Einfluss als die Expression heterologer Gene. Die starke Inhibierung der SAT aus *C. glutamicum* durch L-Cystein, wie sie in *in vitro*-Analysen beschrieben wurde (Haitani *et al.*, 2006), scheint *in vivo* somit nicht so einen starken Einfluss zu haben, da die intrazellulären Substratkonzentrationen vermutlich deutlich höher sind, als die im Enzymassay. Für *in vitro* erhobene Daten zur Aktivitätskontrolle ist bereits bekannt, dass sie in Bezug auf gesteigerte Produktbildung limitierend sind (Morbach *et al.*, 1995). Zusätzlich muss erwähnt werden, dass sich in diesem Experiment nur die Basalexpression von P_{tac} zunutze gemacht wurde, da sich die Induktion mit IPTG sowohl auf das Wachstum als auch auf die Produktbildung negativ auswirkte (Daten nicht gezeigt).

3.2.4 Deletion von *aecD*

Ein weiterer vielversprechender Ansatz für die Bildung von L-Cystein ist es, den Abbau dieser Aminosäure durch die Zelle zu verhindern. In *C. glutamicum* sind bereits mehrere Enzyme bekannt, die dafür in Frage kommen und die Cystein-Desulfurase-Aktivität haben (Marienhagen *et al.*, 2005). Für das Enzym AecD konnte bereits gezeigt werden, dass die Deletion einen positiven Einfluss auf die L-Cystein-Produktion hat (Wada *et al.*, 2002). Annotiert als Cystathionin β -Lyase (Kim *et al.*, 2001) ist die physiologische Rolle des Enzyms die Katalyse der Reaktion von L-Cystathionin zu L-Homocystein bei der Transsulfurierung im L-Methionin-Stoffwechsel. Der Abbau von L-Cystein ist vermutlich nur eine Nebenreaktion. Da *C. glutamicum* L-Methionin auch über direkte Sulfhydrylierung synthetisieren kann, ist das *aecD*-Gen nicht essentiell (Hwang *et al.*, 2002; Rossol & Pühler, 1992). Für die Deletion von *aecD* im Ser4-Stamm wurde das Plasmid pK19mobsacB Δ *aecD* verwendet. Nach erfolgreicher Deletion wurden die Gene *cysK* und *cysE* im resultierenden Stamm Ser4 Δ *aecD* durch Transformation mit *pcysKE* exprimiert. Die Kultivierung wurde wie in Abschnitt 3.1.1. beschrieben durchgeführt und das Wachstum sowie die Produktion von L-Serin und L-Cystein mittels HPLC-MS bestimmt. Der Versuch wurde mehrmals durchgeführt, Abb. 3.6 zeigt Mittelwerte und Standardabweichung.

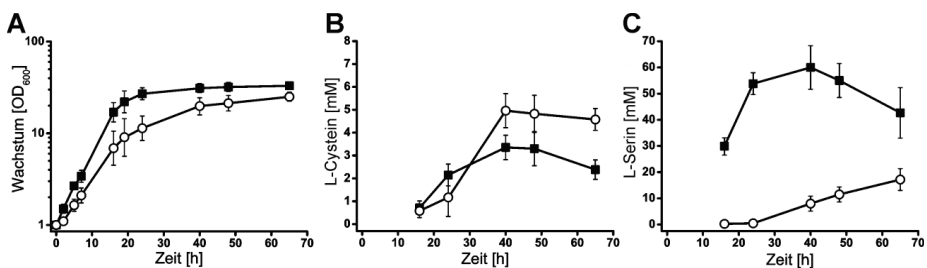


Abb. 3.6: Bildung von L-Cystein und L-Serin mit *C. glutamicum* Ser4 Δ *aecD* *pcysKE*. Dargestellt ist das Wachstum in CGXII und die Konzentration an L-Cystein und L-Serin über die Zeit. A: Wachstum, B: L-Cystein-Bildung, C: L-Serin-Bildung. ■: *C. glutamicum* Ser4 Δ *aecD* pKEEx2, ○: *C. glutamicum* Ser4 Δ *aecD* *pcysKE*.

Die Expression von *cysK* und *cysE* in Ser4 Δ *aecD* zeigte eine Reduktion des Wachstums im Vergleich zum Stamm mit Leerplasmid. Beim Blick auf die Produktbildung wurde deutlich,

dass L-Cystein im Überstand von Ser4 Δ *aecD* mit dem Leervektor gegenüber Ser4 bereits erhöht vorlag ($3,3 \pm 0,5$ mM, Vgl. Abschnitt 3.2.3) und dass mit Ser4 Δ *aecD* bei Expression von *cysK* und *cysE* L-Cystein auf $4,9 \pm 0,8$ mM zunahm. Damit ergibt sich ein komplexes Bild: Die *aecD*-Deletion ist vorteilhaft, jedoch nicht in jedem Stammhintergrund. Die *cysKE*-bedingte Reduktion der L-Serin-Bildung erfolgte sowohl bei dem Stamm Ser4 als auch bei Ser4 Δ *aecD*. Das schlechte Wachstum und der nur mäßig positive Effekt auf die L-Cystein-Bildung bei Deletion von *aecD* und Expression von *cysK* und *cysE* könnten durch einen intrazellulären Anstau von L-Cystathionin erklärt werden. Bei den Analysen der intrazellulären Metabolit-Konzentrationen (3.3.2.2) zeigte sich bei Ser4 Δ *aecD* ein deutlicher Peak von L-Cystathionin, während beim Stamm Ser4 L-Cystathionin nicht nachweisbar war (Daten nicht gezeigt). L-Cystathionin entsteht bei der durch die Cystathionin β -Synthase MetB vermittelten Reaktion von O-Acetyl-L-Homoserin und L-Cystein (Hwang *et al.*, 1999) und kann durch die Deletion von *aecD* vermutlich nicht weiter verstoffwechselt werden.

3.2.5 Deletion von *metX*

Um den beobachteten Anstau von L-Cystathionin in Ser4 Δ *aecD* zu umgehen, sollte zunächst *metB* deletiert werden. Damit wäre der Weg der Transsulfurierung komplett unterbunden, jedoch die Bereitstellung von L-Homocystein für die L-Methionin-Synthese durch die direkte Sulfhydrylierung weiterhin gegeben. Die Deletion von *metB* in Ser4 Δ *aecD* war erfolgreich, allerdings zeigte der Stamm schlechtes Wachstum und bildete kein L-Cystein und nur sehr geringe Mengen an L-Serin (Daten nicht gezeigt). Da der L-Serin-Produzent Ser4 und seine Derivate unter Folsäure-Mangel kultiviert werden und dadurch die Bereitstellung von C1-Körpern, die auch für die L-Methionin-Synthese benötigt werden, stark eingeschränkt ist, wird vermutet, dass diese Stämme bereits unter einer L-Methionin-Limitation leiden, sodass es möglicherweise mehr Sinn macht, die komplette L-Methionin-Synthese auszuschalten und die Stämme mit L-Methionin zu supplementieren. Da bereits bekannt ist, dass die Deletion des Gens *metX*, welches für die Homoserin-Acetyltransferase kodiert, zur L-Methionin-Auxotrophie führt (Rückert *et al.*, 2003), sollte dieses Gen in Ser4 und Ser4 Δ *aecD* deletiert werden. Die Deletion wurde mithilfe des Plasmids pK19*mobsacB* Δ *metX* erfolgreich eingeführt und resultierte in den Stämmen Ser4 Δ *metX* und Ser4 Δ *aecD* Δ *metX*. Die Deletionsmutanten waren nicht in der Lage, auf CGXII-Minimalmedium zu wachsen, die Supplementation mit 2 mM L-Methionin konnte das Wachstum jedoch wiederherstellen (Abb. 3.7).

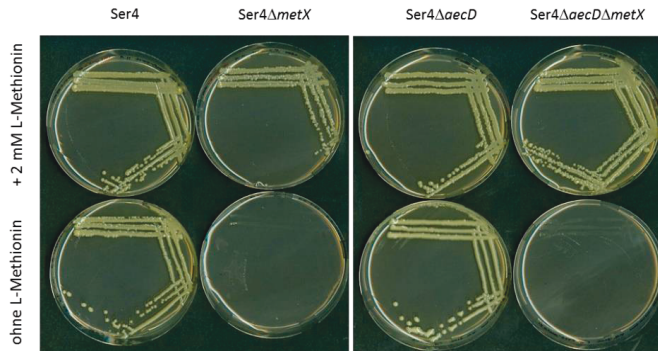


Abb. 3.7: Wachstum von *C. glutamicum* Ser4, Ser4ΔmetX, Ser4ΔaecD und Ser4ΔaecDΔmetX auf CgXII-Minimalmedium-Platten ohne Supplementation und mit 2 mM L-Methionin.

Um den Einfluss der *metX*-Deletion auf die L-Cystein- und L-Serin-Bildung zu untersuchen, wurden die Stämme Ser4ΔmetX und Ser4ΔaecDΔmetX mit dem Expressionsplasmid *pcysKE* transformiert sowie zur Kontrolle mit dem Leervektor pEKE2. Die Kultivierung wurde wie in Abschnitt 3.1.1. beschrieben durchgeführt, wobei das Minimalmedium CGXII mit 2 mM L-Methionin supplementiert wurde. Das Wachstum wurde über die Zeit verfolgt und die Produktbildung mittels HPLC-MS untersucht. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt. Abb. 3.8 zeigt Mittelwerte und Standardabweichung der Versuche.

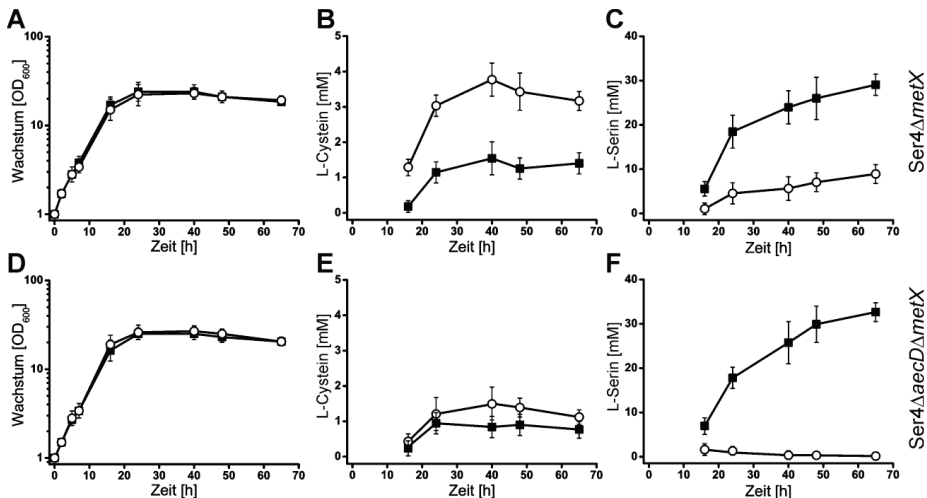


Abb.3.8: Bildung von L-Cystein und L-Serin mit *C. glutamicum* Ser4ΔmetX *pcysKE* (A-C) und Ser4ΔaecDΔmetX *pcysKE* (D-F). Dargestellt ist das Wachstum in CGXII und die Konzentration an L-Cystein und L-Serin über die Zeit. A, D: Wachstum, B, E: L-Cystein-Bildung, C, F: L-Serin-Bildung. ■: Stämme mit pEKE2, ○: Stämme mit *pcysKE*.

Die Deletion von *metX* zeigte keinen negativen Einfluss auf das Wachstum. Im Gegenzug dazu ließ die Deletion aber auch keinen positiven Einfluss auf die Produktbildung

erkennen. Während der Stamm *Ser4ΔmetX* pEKEx2 mit $1,5 \pm 0,5$ mM L-Cystein eine leicht erhöhte Produktbildung zeigte, konnte bei Expression von *cysK* und *cysE* nur eine moderate Steigerung der L-Cystein-Konzentration auf $3,7 \pm 0,4$ mM im Überstand beobachtet werden. Gleichzeitig zeigte sich eine dramatische Reduktion der L-Serin-Bildung von $29,1 \pm 2,5$ mM auf $8,2 \pm 2,4$ mM. In Kombination mit $\Delta metX$ wirkte sich die *aecD*-Deletion negativ aus. Dabei reichte die Menge von gebildetem L-Cystein weder in *Ser4ΔaecDΔmetX* pEKEx2 noch in *Ser4ΔaecDΔmetX* pEKEx2 mit $0,95 \pm 0,32$ bzw. $1,49 \pm 0,42$ mM an die Werte aus dem vorhergehenden Experiment mit *Ser4ΔaecD* heran. Auch hier konnte der stark negative Effekt auf die L-Serin-Bildung beobachtet werden. Da das Wachstum der Stämme unbeeinflusst ist, ist auf einen regulatorischen Effekt zu schließen.

3.2.6 Schwefel-Verfügbarkeit

Zur Verbesserung der Schwefel-Versorgung in den Zellen war es das Ziel, den gesamten Gencluster *fpr2-cysIXHDNYZ*, der 8,5 kb umfasst und für acht Gene zur Aufnahme und Reduktion von Sulfat kodiert (Rückert *et al.*, 2005), unter den nativen Promotoren zu exprimieren. Hierfür wurde der Vektor pBHC18 ausgewählt, der sowohl wegen seiner geringen Größe (3,2 kb) als auch wegen seiner geringen Kopienzahl von weniger als zehn Kopien pro Zelle geeignet schien (Kirchner & Tauch, 2003). Die Stämme *Ser4* und *Ser4ΔaecD* wurden mit dem resultierenden Plasmid pRedOp transformiert und anschließend kultiviert. Die Kultivierung wurde wie in Abschnitt 3.1.1. beschrieben durchgeführt und das Wachstum sowie die Produktion von L-Serin und L-Cystein mittels HPLC-MS bestimmt. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt. Abb. 3.9 zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der Versuche.

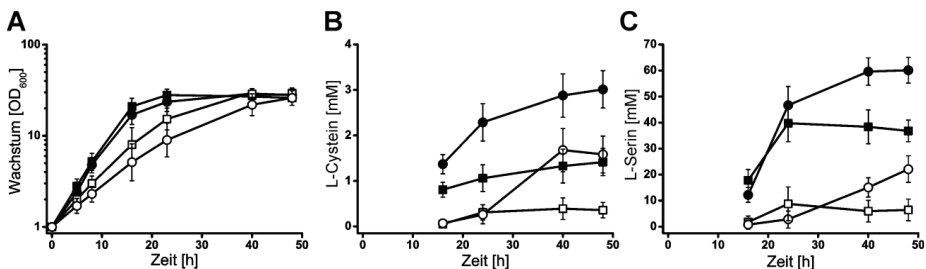


Abb. 3.9: Bildung von L-Cystein und L-Serin mit *C. glutamicum* Ser4 pRedOp und Ser4ΔaecD pRedOp
Dargestellt ist das Wachstum in CGXII und die Konzentration an L-Cystein und L-Serin über die Zeit. A: Wachstum, B: L-Cystein-Bildung, C: L-Serin-Bildung. ■: *C. glutamicum* Ser4 pBHC18, □: *C. glutamicum* Ser4 pRedOp, ●: *C. glutamicum* Ser4ΔaecD pBHC18, ○: *C. glutamicum* Ser4ΔaecD pRedOp.

Die Expression des Reduktionsoperons führte sowohl in *Ser4* als auch in *Ser4ΔaecD* zu einer Verminderung des Wachstums, wobei *Ser4ΔaecD* stärker beeinflusst war. In beiden Expressionsstämmen war die L-Serin-Bildung im Vergleich zur Kontrolle stark vermindert. *Ser4* pRedOp und *Ser4ΔaecD* pRedOp akkumulierten $8,3 \pm 6,6$ mM bzw. $21,2 \pm 5,1$ mM L-Serin, wohingegen die Kontrollen mit Leerplasmid $39,8 \pm 7,2$ mM bzw. $60,5 \pm 5,3$ mM L-Serin bildeten. Die L-Cystein-Bildung war mit $1,65 \pm 0,52$ mM in *Ser4ΔaecD* pRedOp und

0,35 ± 0,25 mM in Ser4 pRedOp im Vergleich zu den Kontrollen mit 2,9 ± 0,4 mM (Ser4Δ*aecD* pBHC18) und 1,4 ± 0,3 mM (Ser4 pBHC18) reduziert. Zusätzlich zeigten die Kulturen mit pRedOp am Ende der Kultivierung eine rötliche Färbung. Es wurde vermutet, dass die Färbung der Kulturen auf eine vermehrte Bildung von Sirohäm zurückzuführen ist, welches der Kofaktor der Sulfid-Reduktase CysI ist. Sequenzvergleiche zeigen außerdem, dass es sich bei CysY vermutlich um eine Sirohydrochlorin-Ferrochelataase handelt (Rückert *et al.*, 2005). Die Gene *cysI* und *cysY* sind Bestandteile des acht Gene umfassenden Operons in pRedOp und die Bildung von Sirohäm kann als Indiz für die Funktionalität der Enzyme der assimilatorischen Sulfat-Reduktion angesehen werden. Analysen der Kulturen mittels Differenzspektroskopie konnten diese Vermutung jedoch nicht bestätigen, was aber wahrscheinlich daran lag, dass das Sirohäm-Signal von den Hämen der Cytochrome aus der Atmungskette überlagert wird.

3.3 Entwicklung eines Biosensors zur intrazellulären Detektion der Metabolite *O*-Acetyl-L-Serin und *O*-Acetyl-L-Homoserin in *C. glutamicum*

Die Bedeutung von *O*-Acetyl-L-Serin (OAS) und *O*-Acetyl-L-Homoserin (OAH) als Schlüsselmetabolite im Schwefel-Stoffwechsel wird dadurch widerspiegelt, dass Bakterien die Konzentration dieser Intermediate mithilfe von Proteinen wahrnehmen können. In *E. coli* und *S. typhimurium* übernimmt der Transkriptionsfaktor CysB diese Aufgabe und aktiviert in Anwesenheit von OAS bzw. von seinem Derivat *N*-Acetyl-L-Serin (NAS) die Transkription von Zielgenen des Cystein-Regulons (Colyer & Kredich, 1996). Der CysB entsprechende Transkriptionsfaktor in *C. glutamicum* ist CysR. Dieser Regulator benötigt OAS bzw. OAH als Effektor, um die Transkription der Gene für die assimilatorische Aufnahme und Reduktion von Sulfat zu aktivieren (Rückert *et al.*, 2008).

3.3.1 Konstruktion der Biosensor-Varianten

Es wurde erwartet, dass die Fusion einer CysR-Bindestelle mit *eyfp* zu erhöhter Fluoreszenz in Zellen mit erhöhter OAS- bzw. OAH-Konzentration führen würde. Die CysR-Bindestelle vor *cysI* wurde anhand von *in vitro*-Experimenten ausgewählt, in denen bereits gezeigt worden war, dass CysR in Anwesenheit von OAS bzw. OAH bindet (Rückert *et al.*, 2008). Zusätzlich wurde die Bindestelle vor NCgl1289 ausgesucht, da dieses eins der wenigen Gene ist, welches ausschließlich von CysR und nicht zusätzlich noch von McbR, einem anderen wichtigen Regulator des Schwefel-Metabolismus, kontrolliert wird. Die CysR-Bindestelle vor NCgl1289 ist aufgrund von *in silico*-Analysen vorhergesagt, wurde aber noch nicht experimentell bestätigt (Rückert *et al.*, 2008).

Für die Konstruktion von pSenOAS1 wurde ein 1359 bp großes Fragment amplifiziert, welches *cysR* mitsamt seinem Promotor enthält. Gleichzeitig wurde ein 302 bp großes Fragment amplifiziert, welches die CysR-Bindestelle vor NCgl1289 enthielt, den Promotor von NCgl1289 sowie die ersten 96 bp des *open reading frames* von NCgl1289. Mittels *overlap extension* PCR wurden die beiden Fragmente fusioniert und die resultierende Kassette mithilfe der Schnittstellen *NdeI* und *Sall* in das Rückgrat von pSenLys eingefügt (Binder *et al.*, 2012), aus welchem vorher die L-Lysin-Sensorkassette ausgeschnitten worden war. Der Sensor pSenOAS3 wurde auf die gleiche Weise konstruiert. Hierfür wurde ein 356 bp langes Fragment amplifiziert, welches die CysR- und McbR-Bindestelle vor *cysI*

enthielt, den Promotor von *cysI* sowie die ersten 126 bp des *open reading frames* von *cysI*. Eine schematische Darstellung der Sensorkassetten ist in Abb. 3.10 gezeigt.

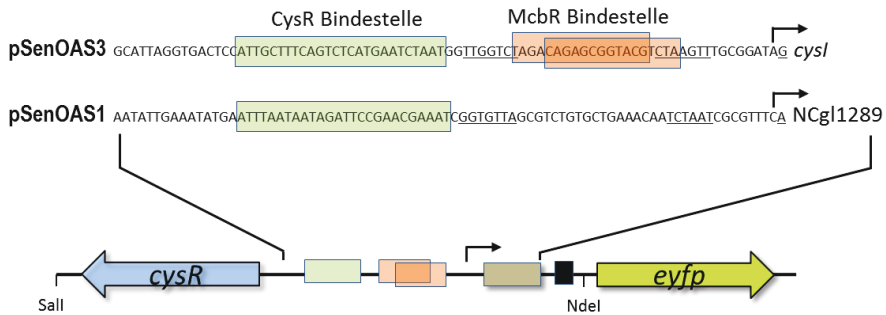


Abb. 3.10: Schematische Darstellung der Sensorkassetten in pSenOAS. Die Sensorkassette besteht aus dem Gen für den Regulator CysR, welches invers zu den jeweiligen Promotorbereichen vor NCgl1289 und *cysI* angeordnet ist. Die Promotorbereiche schließen die ersten 96 bp bzw. 126 bp des *open reading frames* der jeweiligen Gene ein (graue Box) und sind mit einer Ribosomenbindestelle fusioniert (Martin *et al.* (2003), schwarze Box), die stromaufwärts von *eyfp* liegt, welches bereits auf pSenLys vorlag. Die CysR-Bindestellen sind in grün sowie die McbR-Bindestellen in orange dargestellt. Die -10- sowie die -35-Region sind unterstrichen.

3.3.2 Untersuchungen zur OAS-abhängigen Fluoreszenz

Da L-Cystein über OAS von L-Serin aus gebildet wird, eignen sich die Stämme Ser4 und Ser4 Δ *aecD*, die bereits ungefähr 1 mM bzw. 3,5 mM L-Cystein bilden, für die Charakterisierung der Sensoren.

3.3.2.1 Untersuchung der Biosensoren in Stämmen mit unterschiedlicher L-Cystein-Bildung

Die beiden Stämme Ser4 und Ser4 Δ *aecD* sowie der Wildtyp wurden mit pSenOAS1, pSenOAS3 sowie dem Leerplasmid pJC1 transformiert und anschließend kultiviert. Die Kultivierung wurde wie in Abschnitt 3.1.1. beschrieben durchgeführt und das Wachstum sowie die Fluoreszenz der Hauptkulturen im BioLector verfolgt. Die Kultivierung wurde dreimal durchgeführt. Abb. 3.11 zeigt Mittelwerte und Standardabweichung der Versuche.

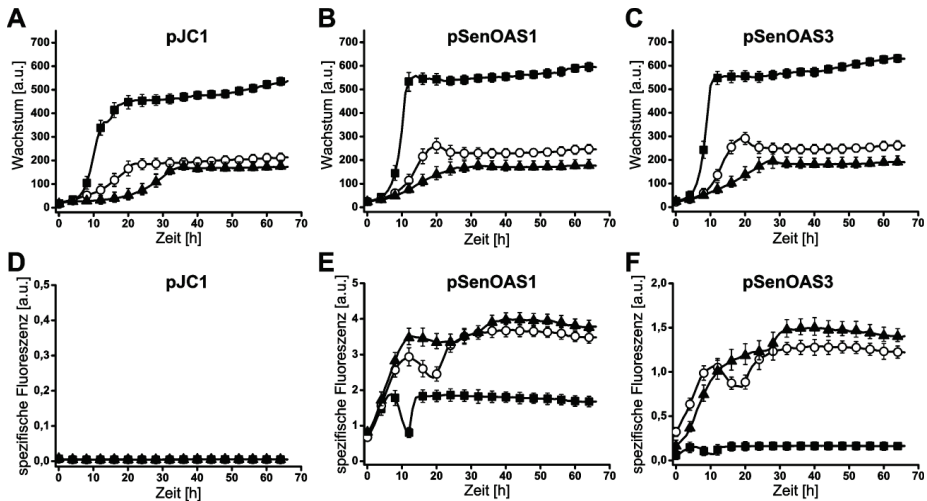


Abb. 3.11: Wachstum und Fluoreszenzentwicklung mit *C. glutamicum* ATCC13032 (WT), *C. glutamicum* Ser4 und *C. glutamicum* Ser4 Δ aecD. Dargestellt ist das Wachstum in CGXII und die Entwicklung der spezifischen Fluoreszenz. A: Wachstum der Stämme mit Leerplasmid pJC1, B: Wachstum der Stämme mit pSenOAS1, C: Wachstum der Stämme mit pSenOAS3, D: spezifische Fluoreszenz der Stämme mit Leerplasmid pJC1, E: spezifische Fluoreszenz der Stämme mit pSenOAS1, F: spezifische Fluoreszenz der Stämme mit pSenOAS3. ■: *C. glutamicum* ATCC13032 (WT), ○: *C. glutamicum* Ser4, ▲: *C. glutamicum* Ser4 Δ aecD.

Das Wachstum von Ser4 und Ser4 Δ aecD mit den verschiedenen Plasmiden war im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert, was daran liegt, dass diese unter Folsäure-Mangel kultiviert werden müssen, um L-Serin-Bildung zu erreichen. Zudem ließ sich erkennen, dass das Wachstum der Ser4 Δ aecD-Derivate im Vergleich zu Ser4 stärker reduziert war, als das bei Kultivierungen in Schüttelkolben der Fall ist. Die spezifische Fluoreszenz der Stämme Ser4 und Ser4 Δ aecD mit den Plasmiden pSenOAS1 und pSenOAS3 war im Vergleich zum Wildtyp stark erhöht und es war erkennbar, dass Ser4 Δ aecD eine höhere spezifische Fluoreszenz als Ser4 aufwies. Die *in vitro* generierten Daten über die Interaktion von CysR mit OAS können für den Promotor von *cysI* also *in vivo* bestätigt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auch vor NCgl1289 eine funktionale CysR-Bindestelle vorliegt. Beide Sensoren zeigten allerdings hinsichtlich ihrer Fluoreszenzintensität erhebliche Unterschiede, wobei für pSenOAS1 eine deutlich erhöhte Grundfluoreszenz im Vergleich zu pSenOAS3 zu erkennen war. Das kann zum einen durch eine unterschiedliche Promotorstärke bedingt sein, zum anderen aber auch durch die Anwesenheit einer McbR-Bindestelle im Promotor von *cysI*. Dadurch kommt es möglicherweise zur Repression der *eyfp*-Expression durch McbR.

Da mittels BioLector-Kultivierung nur die Fluoreszenz der gesamten Kultur aufgenommen werden kann, sollte die Fluoreszenz zusätzlich auf Einzelzell-Ebene analysiert werden. Dafür wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.1.1. kultiviert, die Hauptkultur im BioLector weiter kultiviert und 40 h nach Inokulierung der Hauptkultur mittels Epifluoreszenz-Mikroskopie untersucht (Abb. 3.12). Wie erwartet zeigte der Wildtyp mit beiden

Plasmiden kaum Fluoreszenz, wohingegen Ser4 Δ aecD starke Fluoreszenz mit beiden Plasmiden aufwies. Die Fluoreszenz von Ser4 pSenOAS3 lag zwischen der von WT und Ser4 Δ aecD, was für pSenOAS1 jedoch nicht aus der Abbildung ersichtlich wird. Das kann damit erklärt werden, dass für die Stämme mit pSenOAS1 eine eher kurze Expositionszeit von 10 ms gewählt wurde, wohingegen für die Stämme mit pSenOAS3 eine Expositionszeit von 200 ms verwendet wurde. Bei längeren Expositionszeiten für die Stämme mit pSenOAS1 konnte der Unterschied zwischen WT und Ser4 deutlich beobachtet werden, jedoch waren die Bilder für Ser4 Δ aecD unter diesen Bedingungen überbelichtet. Zusätzlich zeigte sich für die Stämme mit pSenOAS3 eine Heterogenität in der Kultur, da nicht alle Zellen gleich stark fluoreszierten. Diese Heterogenität ist möglicherweise durch eine Repression der *eyfp*-Expression durch McbR bedingt.

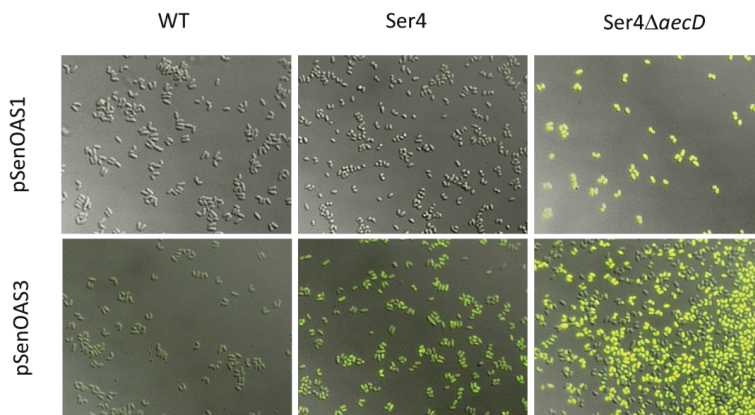


Abb. 3.12: Fluoreszenz der Stämme *C. glutamicum* ATCC13032 (WT), *C. glutamicum* Ser4 und *C. glutamicum* Ser4 Δ aecD auf Einzelzell-Ebene mit den Plasmiden pSenOAS1 und pSenOAS3. Die Expositionszeit für die pSenOAS1-tragenden Stämme war 10 ms, wohingegen für pSenOAS3 200 ms verwendet wurde. Die Epifluoreszenz-Analysen wurden bei folgenden Wellenlängen durchgeführt: λ_{ex} = 490 bis 510 nm und λ_{em} = 520 bis 550 nm.

Für den Regulator der assimilatorischen Sulfat-Reduktion CysB aus *E. coli* konnte bei erhöhter Expression ein positiver Effekt auf die L-Cystein-Bildung untersucht werden (Maier & Winterhalter, 2001). Aus diesem Grund wurde die Auswirkung der *cysR*-Expression als Teil der Sensoren pSenOAS1 und pSenOAS3 auch auf Produktebene untersucht. Dafür wurden die Überstände der in Abb. 3.11 gezeigten Kultivierung nach 64 h mittels HPLC-MS analysiert (Abb. 3.13).

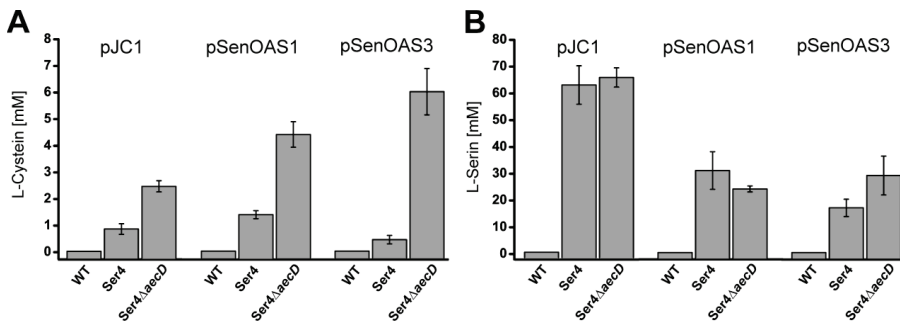


Abb. 3.13: Bildung von L-Cystein und L-Serin mit *C. glutamicum* ATCC13032 (WT), *C. glutamicum* Ser4 und *C. glutamicum* Ser4ΔaecD. Dargestellt sind die über HPLC-MS ermittelten Konzentrationen an L-Cystein und L-Serin im Überstand der Kulturen nach 64 h Kultivierung in CGXII-Medium. Es wurden jeweils drei biologische Replikate angefertigt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung.

Der Wildtyp akkumulierte erwartungsgemäß weder L-Cystein noch L-Serin im Überstand. Die beiden Stämme Ser4 pJC1 und Ser4ΔaecD pJC1 zeigten mit $0,95 \pm 0,2$ mM und $2,6 \pm 0,2$ mM einen graduellen Anstieg in der L-Cystein-Bildung. Die L-Serin-Bildung war mit $62,48 \pm 7,17$ mM und $65,28 \pm 3,61$ mM vergleichbar. In Anwesenheit von pSenOAS1 ergab sich im Vergleich zur Kontrolle mit $1,5 \pm 0,15$ mM L-Cystein für Ser4 und $4,38 \pm 0,48$ mM L-Cystein für Ser4ΔaecD erhöhte Produktbildung. Die L-Serin-Bildung war mit $30,66 \pm 7,01$ mM für Ser4 und $23,78 \pm 1,13$ mM für Ser4ΔaecD stark reduziert. In Anwesenheit von pSenOAS3 kam es zu sehr unterschiedlichen Auswirkungen auf die Produktbildung. So war für Ser4 pSenOAS3 die L-Cystein- und L-Serin-Bildung im Vergleich zur Kontrolle auf $0,43 \pm 0,16$ mM und $16,74 \pm 3,23$ mM stark reduziert, wohingegen Ser4ΔaecD pSenOAS3 eine Zunahme der L-Cystein-Bildung auf $6,0 \pm 0,87$ mM aufwies. Die L-Serin-Konzentration in diesem Stamm war mit $28,81 \pm 7,24$ mM vergleichbar zu Ser4ΔaecD pSenOAS1 mit $23,78 \pm 1,13$ mM. Diese Ergebnisse waren unerwartet. Da sich die beiden Sensorkonstrukte nur in ihrer CysR-Binderegion vor *eyfp* unterscheiden, sind die Gründe für die unterschiedlichen Effekte hier zu suchen. Durch die zusätzliche McbR-Bindestelle vor *cysI* auf pSenOAS3 könnte es zur Austitrierung von McbR durch die Plasmidkopien in den Zellen kommen, was gleichzeitig zu einer erhöhten Verfügbarkeit an freiem CysR-Regulator führt, der mit der chromosomalen DNA interagieren kann. Um diesen Effekt abschließend erklären zu können, müssten weitere Experimente durchgeführt werden.

3.3.2.2 Intrazelluläre OAS-Konzentrationsbestimmung mittels Silikonölzentrifugation

In den beiden Stämmen mit erhöhter L-Cystein-Bildung, Ser4 und Ser4ΔaecD, konnte eine erhöhte Fluoreszenz mittels der Biosensoren detektiert werden. Dem liegt vermutlich eine erhöhte intrazelluläre Konzentration des Schwefel-Akzeptor-Moleküls OAS zugrunde. Die Umwandlung von L-Serin zu L-Cystein erfolgt in zwei Schritten und der Einbau von Sulfid in OAS wird durch die O-Acetylserin-Sulfhydrylase (OASS) vermittelt. Aufgrund der hohen Energiekosten für die Bereitstellung von Sulfid kann dieser Schritt bei der Bildung von L-

Cystein limitierend sein (Kredich, 1996). Demnach ist eine erhöhte OAS-Konzentration ein Signal für mangelnde Verfügbarkeit von Sulfid und die Expression der von CysR regulierten Gene eine logische Konsequenz der Interaktion. Zur Bestimmung der intrazellulären OAS-Konzentration wurde der Wildtyp sowie die Stämme Ser4 und Ser4 Δ aecD mit pSenOAS1 in Schüttelkolben kultiviert und in der exponentiellen Phase der Hauptkultur Zellen der Silikonölzentrifugation zugeführt. Nach Aufarbeitung wurden die intrazellulären Konzentrationen von OAS mittels HPLC-MS bestimmt. Sie sind in Abb. 3.14 dargestellt.

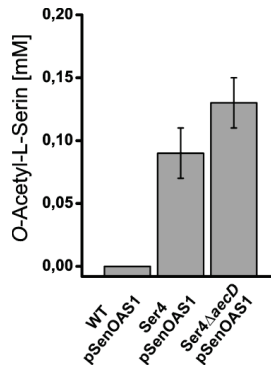


Abb. 3.14: Intrazelluläre *O*-Acetyl-L-Serin-Konzentrationen von *C. glutamicum* ATCC13032 (WT), *C. glutamicum* Ser4 und *C. glutamicum* Ser4 Δ aecD. Dargestellt sind die mittels Silikonölzentrifugation und HPLC-MS ermittelten Konzentrationen an *O*-Acetyl-L-Serin in der exponentiellen Wachstumsphase in CGXII-Medium. Es ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei biologischen Replikate angegeben.

Während die OAS-Konzentration im Wildtyp unter dem Detektionslimit von 0,02 mM lag, konnte für Ser4 pSenOAS1 eine Konzentration von $0,09 \pm 0,02$ mM und für Ser4 Δ aecD pSenOAS1 eine OAS-Konzentration von $0,13 \pm 0,02$ mM bestimmt werden. OAH wurde in keinem der drei Stämme detektiert. Somit konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Fluoreszenz der Sensoren mit einer erhöhten intrazellulären Konzentration von OAS einhergeht.

3.3.3 Untersuchungen zur OAH-abhängigen Fluoreszenz

Anhand von *in vitro*-Daten wurde gezeigt, dass CysR neben OAS auch mit *O*-Acetyl-L-Homoserin (OAH) interagiert (Rückert *et al.*, 2008). Um auch OAH-spezifische Fluoreszenz *in vivo* nachweisen zu können, wurde ein entsprechendes Testsystem entwickelt. OAH ist der Schwefel-Akzeptor der L-Methionin-Synthese und wird wie L-Threonin von L-Homoserin aus gebildet. In einer früheren Arbeit wurde der L-Threonin-Produzent *C. glutamicum* KK42 entwickelt (Morbach *et al.*, 1996), welcher als Ausgangsstamm für die Entwicklung des Testsystems dienen sollte.

3.3.3.1 Expression von *metX* im L-Threonin-Produzenten KK42

Um eine erhöhte intrazelluläre Konzentrationen von OAH in *C. glutamicum* KK42 zu generieren, sollte das Gen *metX*, welches für die Homoserin-Acetyltransferase kodiert,

exprimiert werden. Die Homoserin-Acetyltransferase acetyliert L-Homoserin zu OAH. Das Gen wurde mittels PCR und chromosomaler DNA des Wildtyps amplifiziert und in den Vektor pCLTON2 eingebracht. Dieses Plasmid ermöglicht eine kontrollierte Expression durch die Induktion mit Anhydrotetracyklin (ATC) (Lausberg *et al.*, 2012). Die Stämme KK42 pSenOAS1 und KK42 pSenOAS3 wurden mit dem Vektor pCLTON2*metX* sowie zur Kontrolle mit dem Leerplasmid pCLTON2 transformiert. Die Kultivierung wurde wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben durchgeführt und das Wachstum der Hauptkulturen im BioLector verfolgt. Das CGXII-Medium wurde mit 2 mM L-Leucin supplementiert, da der Stamm KK42 für diese Aminosäure eine Auxotrophie aufweist. Die Hauptkulturen wurden mit 0-150 ng/ml ATC induziert. Die Kultivierung wurde dreimal durchgeführt und die Mittelwerte sowie die Standardabweichung in Abb. 3.15 und Abb. 3.16 dargestellt.

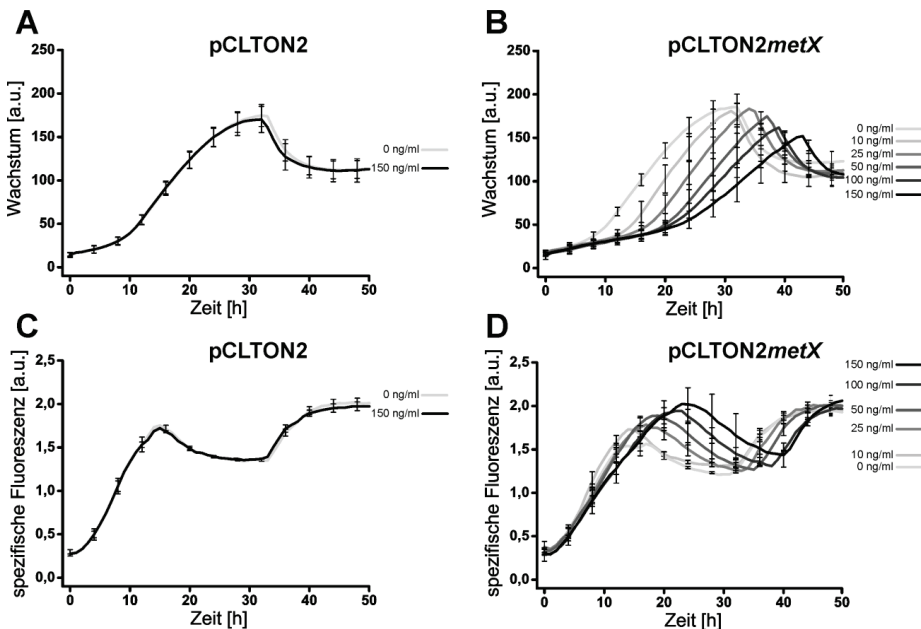


Abb. 3.15: Wachstum und Fluoreszenzentwicklung mit *C. glutamicum* KK42 pSenOAS1 pCLTon2*metX*.
Dargestellt ist das Wachstum in CGXII mit verschiedenen Konzentrationen an Anhydrotetracyklin (ATC) und die Entwicklung der spezifischen Fluoreszenz über die Zeit. A: Wachstum mit *C. glutamicum* KK42 pSenOAS1 pCLTON2, B: Wachstum mit *C. glutamicum* KK42 pSenOAS1 pCLTON2*metX*, C: spezifische Fluoreszenz mit *C. glutamicum* KK42 pSenOAS1 pCLTON2, D: spezifische Fluoreszenz mit *C. glutamicum* KK42 pSenOAS1 pCLTon2*metX*. —: 0 ng/ml, —: 10 ng/ml, —: 25 ng/ml, —: 50 ng/ml, —: 100 ng/ml, —: 150 ng/ml.

Die Stämme KK42 pSenOAS1 pCLTON2*metX* und KK42 pSenOAS3 pCLTON2*metX* zeigten bei gradueller Expression von *metX* eine graduelle Abnahme des Wachstums. Da die Kontrollen mit Leervektor bei Induktion mit 150 ng/ml ATC keine Veränderung des Wachstums aufwiesen, ist dies auf die Expression oder Aktivität der Homoserin-Acetyltransferase zurückzuführen. Zusätzlich konnte bei zunehmender Expression von

metX auch die erwartete Zunahme der spezifischen Fluoreszenz beobachtet werden. Dieser Effekt war für die Stämme mit pSenOAS3 stärker als mit pSenOAS1. Zusätzlich war, wie bereits für die OAS-abhängige Fluoreszenz gezeigt wurde, die Grundfluoreszenz für pSenOAS1 deutlich höher im Vergleich zu pSenOAS3.

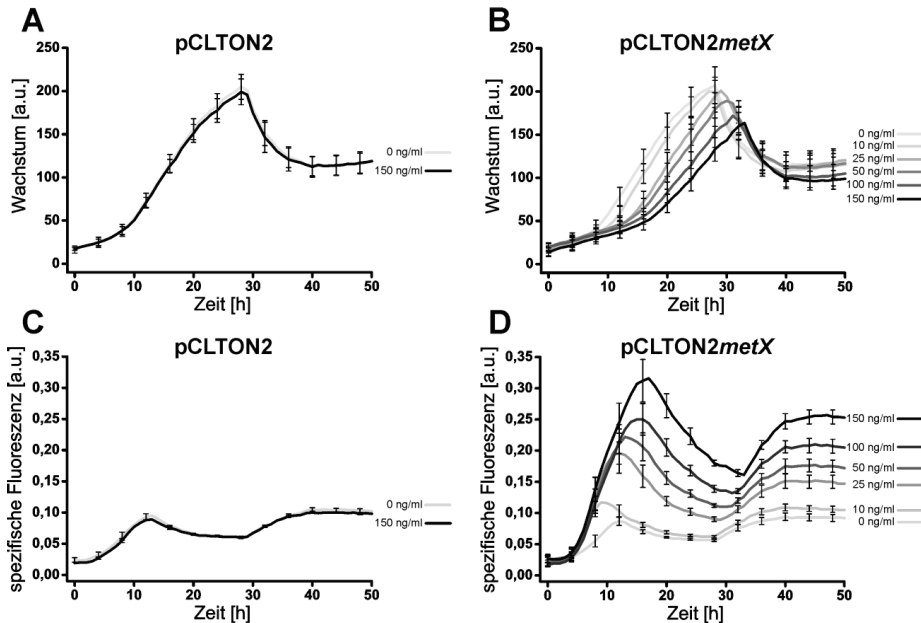


Abb. 3.16: Wachstum und Fluoreszenzentwicklung mit *C. glutamicum* KK42 pSenOAS3 pCLTon2metX. Dargestellt ist das Wachstum in CGXII mit verschiedenen Konzentrationen an Anhydrotetracyklin (ATC) und die Entwicklung der spezifischen Fluoreszenz über die Zeit. A: Wachstum mit *C. glutamicum* KK42 pSenOAS3 pCLTon2, B: Wachstum mit *C. glutamicum* KK42 pSenOAS3 pCLTon2metX, C: spezifische Fluoreszenz mit *C. glutamicum* KK42 pSenOAS3 pCLTon2, D: spezifische Fluoreszenz mit *C. glutamicum* KK42 pSenOAS3 pCLTon2metX. —: 0 ng/ml, —: 10 ng/ml, —: 25 ng/ml, —: 50 ng/ml, —: 100 ng/ml, —: 150 ng/ml.

3.3.3.2 Intrazelluläre OAH-Konzentrationsbestimmung mittels Silikonöltrifugation

Da bereits für OAS eine Korrelation zwischen intrazellulärer Konzentration und Fluoreszenz gezeigt werden konnte, sollte dies auch für OAH durchgeführt werden. Für die Bestimmung der intrazellulären OAH-Konzentration wurde der Stamm *C. glutamicum* KK42 pSenOAS1 pCLTON2metX ohne und mit Zugabe von 150 ng/ml ATC in Schüttelkolben kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase Silikonöltrifugation durchgeführt. Die intrazellulären Konzentrationen von OAH wurden mittels HPLC-MS bestimmt und die berechneten intrazellulären Konzentrationen sind in Abb. 3.17 dargestellt.

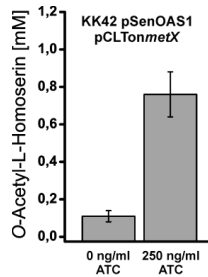


Abb. 3.17: Intrazelluläre *O*-Acetyl-L-Homoserin-Konzentrationen von *C. glutamicum* KK42 pSenOAS1 pCLTon2*metX*. Dargestellt sind die mittels Silikonölzentrifugation und HPLC-MS ermittelten Konzentrationen an *O*-Acetyl-L-Homoserin nach Wachstum in CGXII-Medium mit und ohne Zugabe von Anhydrotetracyclin (ATC). Es ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei biologischen Replikate angegeben.

Die nicht-induzierte Kultur wies eine OAH-Konzentration von $0,11 \pm 0,03$ mM auf und die induzierte Kultur $0,76 \pm 0,12$ mM. Diese Konzentrationen sind im Vergleich zu Messungen, die mit *C. glutamicum* Wildtyp durchgeführt wurden, um den Faktor 10 erhöht (Bolten *et al.*, 2010). OAS konnte nicht nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass es mit zunehmender Expression von *metX* zu einem intrazellulären Anstau von OAH kommt, weist darauf hin, dass die nachfolgenden Schritte der L-Methionin-Synthese, wie der Einbau von Schwefel sowie die Übertragung der Methylgruppe, limitierend sind.

3.3.4 Fluoreszenz der Biosensoren unter Schwefel-Mangel

Da erfolgreich gezeigt wurde, dass die Sensoren pSenOAS1 und pSenOAS3 die Metabolite OAS und OAH detektieren können, sollten diese für die *in vivo*-Visualisierung der Konsequenzen von Schwefel-Mangel auf Metaboliten-Ebene eingesetzt werden. Hierfür wurde der *C. glutamicum* Wildtyp mit den Plasmiden pSenOAS1 und pSenOAS3 mit verschiedenen Konzentrationen an Ammoniumsulfat kultiviert. Für die Kultivierung wurden die Stämme über Nacht in CGIII-Medium kultiviert und nach 16 h in das schwefelfreie Medium MMES inokuliert. Nach Kultivierung unter schwefellimitierenden Konditionen über 24 h wurden die Zellen in MMES mit verschiedenen Ammoniumsulfat-Konzentrationen kultiviert und das Wachstum sowie die Fluoreszenz mithilfe des BioLectors über einen Zeitraum von 64 h aufgenommen. Die Kultivierung wurde dreimal durchgeführt. Abb. 3.18 zeigt Mittelwerte und Standardabweichung.

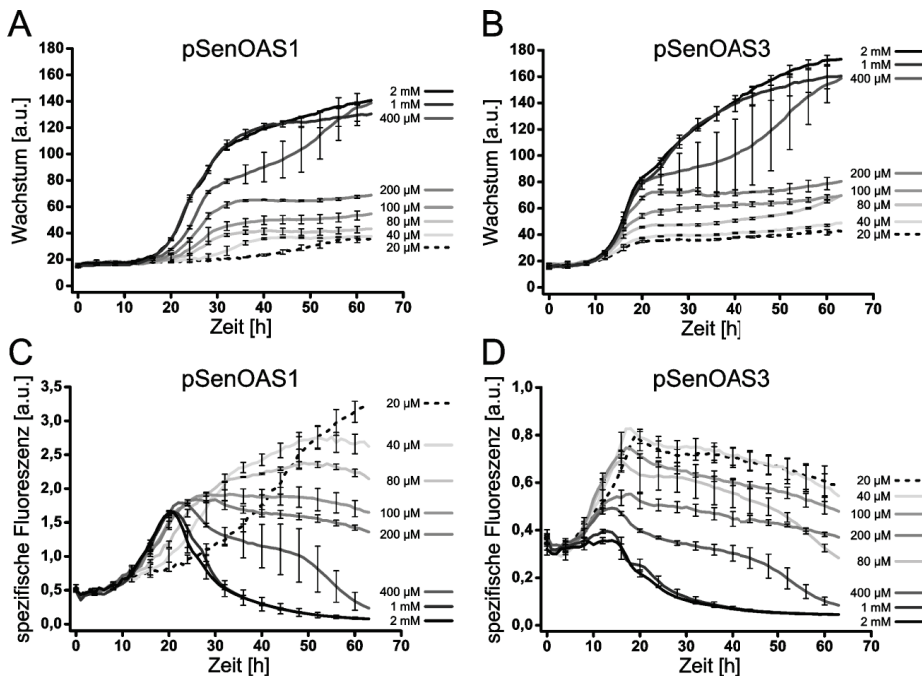


Abb. 3.18: Wachstum und Fluoreszenzentwicklung mit *C. glutamicum* ATCC13032 unter Schwefel-Mangel. Dargestellt ist das Wachstum in CGXII mit verschiedenen Konzentrationen an Ammoniumsulfat und die Entwicklung der spezifischen Fluoreszenz über die Zeit. A: Wachstum mit *C. glutamicum* ATCC13032 pSenOAS1, B: Wachstum mit *C. glutamicum* ATCC13032 pSenOAS3, C: spezifische Fluoreszenz mit *C. glutamicum* ATCC13032 pSenOAS1, D: spezifische Fluoreszenz mit *C. glutamicum* ATCC13032 pSenOAS3.: 20 µM, —: 40 µM, —: 80 µM, —: 100 µM, —: 200 µM, —: 400 µM, —: 1 mM, —: 2 mM.

Ab einer Konzentration von 1 mM Ammoniumsulfat waren die Stämme nicht mehr im Wachstum limitiert und das Wachstum zeigte keinen Unterschied im Vergleich zu 2 mM Ammoniumsulfat im Medium. Die Limitierung des Wachstums zeigte sich in diesem Experiment erstmals bei einer Konzentration von 400 µM Ammoniumsulfat und mit abnehmender Konzentration von Ammoniumsulfat verringerte sich auch das Wachstum. Gleichzeitig war mit beiden Sensoren eine graduelle Steigerung der spezifischen Fluoreszenz bei abnehmender Schwefel-Verfügbarkeit erkennbar. Auch in diesem Experiment zeigte sich wiederum der Unterschied in der Grundfluoreszenz der beiden Sensoren. Die signifikante Antwort der Fluoreszenz weist auf einen Anstieg der Intermediate OAS und OAH hin, wenn Schwefel limitierend wird. Da in diesem Experiment nicht zwischen OAS und OAH unterschieden werden kann, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Metaboliten gleichermaßen akkumulieren.

3.4 Untersuchungen zum Einfluss des Regulators CysR auf die L-Cystein-Bildung

Aus den vorhergehenden Experimenten mit dem OAS-Biosensor war zu schließen, dass die Expression des Regulators CysR einen positiven Effekt auf die L-Cystein-Bildung hat. Für

den Stamm *Ser4ΔaecD* konnte das mit beiden Sensorkonstrukten gezeigt werden, wohingegen für *Ser4* nur mit pSenOAS1 ein positiver Effekt auf die L-Cystein-Bildung zu erkennen war. pSenOAS3 wirkte sich in diesem Stammhintergrund negativ auf die Produktbildung aus. Um den unterschiedlichen Einfluss von *CysR* als Bestandteil der beiden Sensorplasmide zu verstehen, sollten neue Plasmidkonstrukte hergestellt werden, in denen *cysR* losgelöst von der Sensorkassette exprimiert werden sollte.

3.4.1 Expression von *cysR* unter Kontrolle von P_{tac}

Zunächst sollte *cysR* unter Kontrolle des Promotors P_{tac} gestellt werden. Hierfür wurde das Gen *cysR* amplifiziert und in den Expressionsvektor pEKEx2 eingebracht. Die Stämme *Ser4* und *Ser4ΔaecD* wurden mit dem resultierenden Plasmid pcysR transformiert. Zur Kontrolle wurde der Leervektor pEKEx2 mittransformiert. Die Kultivierung wurde wie in Abschnitt 3.1.1. beschrieben durchgeführt und das Wachstum sowie die Produktion von L-Serin und L-Cystein mittels HPLC-MS bestimmt. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt. Abb. 3.19 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichung.

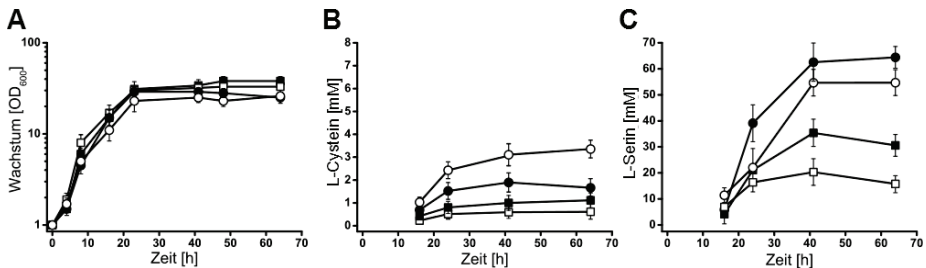


Abb. 3.19: Bildung von L-Cystein und L-Serin von *C. glutamicum* Stämmen mit Expression des Regulators *CysR* unter Kontrolle von P_{tac} . Dargestellt ist das Wachstum in CGXII und die Konzentration an L-Cystein und L-Serin über die Zeit. A: Wachstum, B: L-Cystein-Bildung, C: L-Serin-Bildung. ■: *Ser4* pEKEx2, □: *Ser4* pcysR, ●: *Ser4ΔaecD* pEKEx2, ○: *Ser4ΔaecD* pcysR.

Das Wachstum der Stämme war vergleichbar, einzig *Ser4ΔaecD* pcysR zeigte ein leicht vermindertes Wachstum. Bei der Produktbildung zeigte sich für *Ser4* pcysR im Vergleich zur Kontrolle mit $0,75 \pm 0,32$ mM eine leicht geringere L-Cystein-Bildung. *Ser4* mit Leerplasmid wies $1,21 \pm 0,37$ mM L-Cystein im Überstand auf. Die L-Serin-Bildung war dahingegen mit $20,2 \pm 5,1$ mM im Vergleich zur Kontrolle mit $36,7 \pm 5,3$ mM stärker reduziert. Im Gegensatz dazu bildete *Ser4ΔaecD* pEKEx2 $1,98 \pm 0,51$ mM L-Cystein und $64,8 \pm 4,9$ mM L-Serin sowie *Ser4ΔaecD* pcysR $3,38 \pm 0,46$ mM L-Cystein und $54,2 \pm 5,1$ mM L-Serin. Damit war in diesem Stammhintergrund die L-Cystein-Bildung leicht erhöht. Die Expression von *cysR* unter Kontrolle von P_{tac} verhält sich von der Tendenz her wie die mit pSenOAS3, jedoch sind konkrete Aussagen schwer zu treffen. Es macht wahrscheinlich mehr Sinn, *cysR* mit seinem nativen Promotor zu exprimieren, damit die Experimente vergleichbarer sind.

3.4.2 Expression von *cysR* unter Kontrolle des nativen Promotors

Die Versuche den Regulator getrennt von der Sensorkassette und unter Kontrolle von P_{tac} zu exprimieren, führten nicht zu den erwarteten Erkenntnissen. Im OAS-Biosensor liegt das

Gen von *cysR* zum einen mit seinem nativen Promotor vor, zum anderen wird gleichzeitig noch eine zusätzliche Bindestelle angeboten. Um zu überprüfen, ob der Aufbau der Sensorkassette einen Einfluss auf die beobachteten Effekte hat, wurden neue Plasmide konstruiert. Dabei wurde zum einen *eyfp* aus der Sensorkassette entfernt, sodass *cysR* mit nativem Promotor sowie der Bindestelle von NCgl1289 vorliegt ($pP_{cysR}cysR + P_{NCgl1289}$). Zum anderen wurde *eyfp* und die Bindestelle entfernt, sodass nur *cysR* mit nativem Promotor vorliegt ($pP_{cysR}cysR$). Zur Konstruktion der Plasmide wurden zunächst die entsprechenden Sequenzen amplifiziert und in den Vektor pJC1 eingebracht. Die Stämme Ser4 und Ser4 $\Delta aecD$ wurden mit den entsprechenden Plasmiden $pP_{cysR}cysR + P_{NCgl1289}$ sowie $pP_{cysR}cysR$ transformiert und in einer Kultivierung eingesetzt. Die Kultivierung wurde wie in Abschnitt 3.1.1. beschrieben durchgeführt und das Wachstum sowie die Produktion von L-Serin und L-Cystein mittels HPLC-MS bestimmt. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt. Abb. 3.20 zeigt Mittelwerte und Standardabweichung.

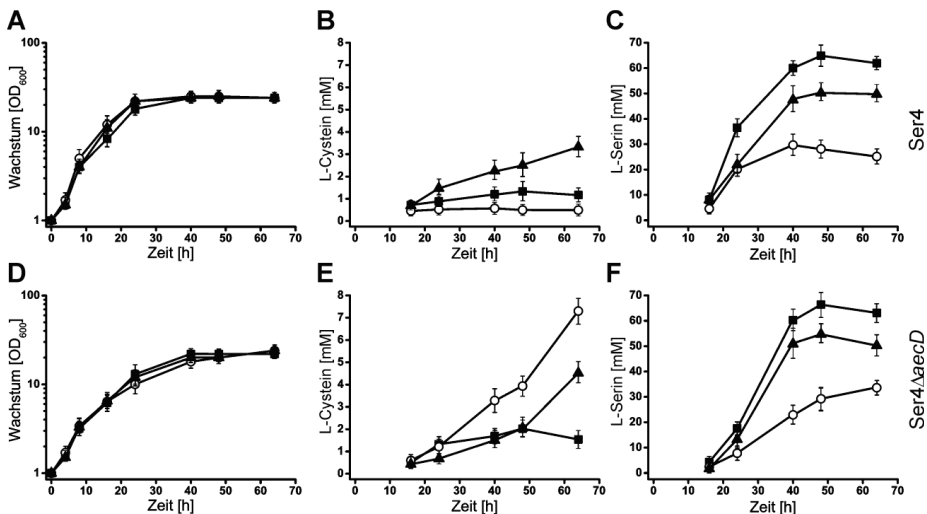


Abb. 3.20: Bildung von L-Cystein und L-Serin von *C. glutamicum* Stämmen mit Expression des Regulators CysR unter Kontrolle des nativen Promotors. Dargestellt ist das Wachstum in CGXII und die Konzentration an L-Cystein und L-Serin über die Zeit. A: Wachstum Ser4, B: L-Cystein-Bildung Ser4, C: L-Serin-Bildung Ser4, D: Wachstum Ser4 $\Delta aecD$, E: L-Cystein-Bildung Ser4 $\Delta aecD$, F: L-Serin Bildung Ser4 $\Delta aecD$. ■: pJC1, ○: $pP_{cysR}cysR$, ▲: $pP_{cysR}cysR + P_{NCgl1289}$.

Im Ser4-Stamm führte die Expression von *cysR* alleine im Vergleich zur Kontrolle mit Leerplasmid zu einer leichten Reduktion der L-Cystein-Bildung von $1,25 \pm 0,43$ mM auf $0,51 \pm 0,27$ mM sowie zu einer starken Verminderung der L-Serin-Bildung von $64,3 \pm 4,4$ mM auf $29,5 \pm 4,2$ mM. Diese Tendenzen konnten auch für *cysR* unter P_{tac} -Kontrolle sowie für pSenOAS3 beobachtet werden. In Kombination mit der CysR-Bindestelle auf dem Plasmid wurde der Effekt auf die L-Serin-Bildung abgeschwächt ($50,5 \pm 3,7$ mM) und es kam zu einer erhöhten L-Cystein-Bildung ($3,15 \pm 0,46$ mM). Diese Ergebnisse passen zu den Daten bezüglich des Plasmids pSenOAS1. Im Stamm Ser4 $\Delta aecD$ waren die Effekte auf die L-Serin-Bildung vergleichbar zu Ser4. Der Stamm mit Leerplasmid

bildete $66,8 \pm 5,1$ mM, *Ser4ΔaecD* $pP_{cysR}CysR$ $34,5 \pm 3,1$ mM und *Ser4ΔaecD* $pP_{cysR}CysR+P_{NCgl1289}$ $55,2 \pm 3,8$ mM L-Serin. In Bezug auf die L-Cystein-Bildung verhielt sich *Ser4ΔaecD* jedoch anders. So führte die Expression von *cysR* alleine mit $7,31 \pm 0,61$ mM zu einer stärkeren L-Cystein-Akkumulation im Vergleich zur Kontrolle mit Leerplasmid ($1,95 \pm 0,36$ mM) und $pP_{cysR}CysR+P_{NCgl1289}$ ($4,53 \pm 0,51$ mM). Damit verhielt sich die Expression von *cysR* unter Kontrolle des nativen Promotors in der Tendenz wie *cysR* unter P_{tac} -Kontrolle und $pSenOAS3$, wohingegen die Kombination mit der CysR-Bindestelle mit den Ergebnissen bezüglich $pSenOAS1$ vergleichbar war. Die neuen Konstrukte liefern eine Erklärung für die Ergebnisse, die mit der Expression von CysR unter Kontrolle des P_{tac} -Promotors beobachtet wurden. Weiterhin zeigen diese Ergebnisse, dass eine vermehrte Expression des Regulators nicht einfach eine erhöhte L-Cystein-Bildung mit sich bringt, sondern eine fein abgestimmte Konzentration des frei verfügbaren Regulators wichtig ist.

3.5 Sulfid-Sensor *E. coli*

In der Arbeit von Chen *et al.* (2012) wurde ein Sulfid-Sensor konstruiert, welcher auf einer zirkulär permutierten GFP-Variante beruht (cpGFP). In dessen Chromophor wird an Stelle eines L-Tyrosins die unnatürliche Aminosäure *p*-Azidophenylalanin (pAzF) eingebaut, welche durch Reaktion mit Sulfid reduziert wird und deswegen zu verstärkter Fluoreszenz führt (Abb. 3.21). Der Einbau von pAzF wird durch ein plasmidkodiertes, orthogonales Aminoacyl-tRNA-Synthetase/tRNA-Paar erreicht sowie einem in der cpGFP-Variante entsprechend vorliegendem *amber codon* TAG (Young *et al.*, 2010). Zur Expression des Sulfid-Sensors in *E. coli* sind somit zwei Plasmide notwendig: Das Plasmid pEvol-pAzF zur Expression der *p*-Azidophenylalanin-tRNA sowie deren Aminoacyl-tRNA-Synthetase und das Plasmid pCDF-1b-cpGFP-TAG, das für das entsprechend mutierte Fluoreszenzprotein kodiert. Es war das Ziel zu prüfen, ob mit diesem System in *E. coli* die intrazelluläre Sulfid-Verfügbarkeit visualisiert werden kann.

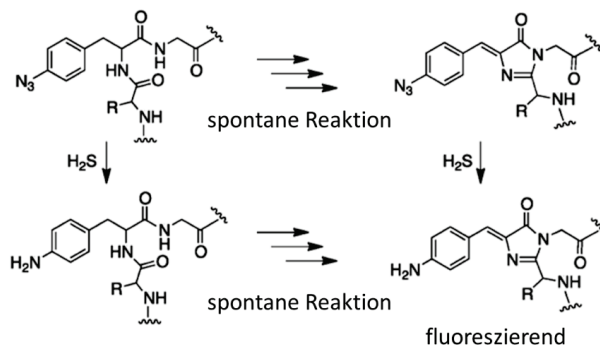


Abb. 3.21: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus des Sulfid-Sensors. Der Austausch der Aminosäure L-Tyrosin durch *p*-Azidophenylalanin im Chromophor des Fluoreszenzproteins führt eine Azidgruppe ein. Diese wird durch Sulfid zum Amin reduziert und führt zur Fluoreszenz des Chromophors (Chen *et al.*, 2012).

Zur Expression wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3) mit pEvol-pAzF und pCDF-1b-cpGFP-TAG kotransformiert und anschließend kultiviert. Die Vorkultur erfolgte über Nacht in 5 ml 2 x YT_{Spec100Cm30} und wurde bei 37 °C inkubiert. Die Hauptkultur wurde mit einer OD_{600nm} von 0,1 in 2 x 50 ml 2 x YT_{Spec100Cm30} angeimpft und bei 37 °C und 120 Upm bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 kultiviert und anschließend auf 26 °C abgekühlt. Die Induktion der Expression der Aminoacyl-tRNA-Synthetase und cpGFP erfolgte mit 0,02 % Arabinose und 1 mM IPTG bei einer OD_{600nm} von 0,7. Einem der Kolben wurden 2 mM der unnatürlichen Aminosäure pAzF hinzugegeben, wohingegen der andere Kolben als Kontrolle ohne pAzF verwendet wurde. Nach 2, 4 und 21 h wurden je 10 ml der Kulturen geerntet, aufgeschlossen und die Rohextrakte 1:100 verdünnt mittels SDS-PAGE analysiert. Zusätzlich wurden Exzitations- und Emissionsspektren der Zellsuspensionen aufgenommen (Abb. 3.22).

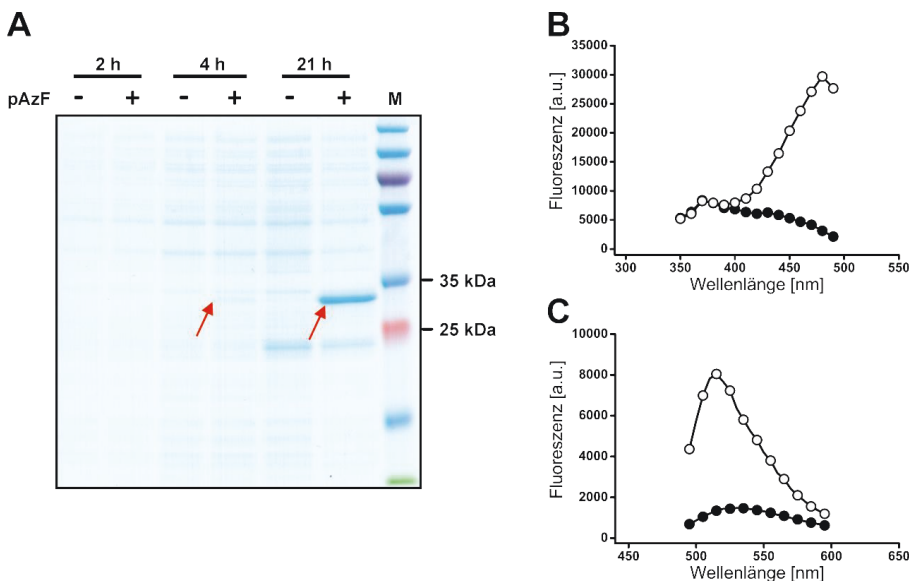


Abb. 3.22: Expression des Sulfid-Sensors in *E. coli*. A: Dargestellt ist ein mittels Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel. Aufgetragen wurde Rohextraktfraktionen aus Expressionskulturen 2, 4 und 21 h nach Induktion und \pm *p*-Azidophenylalanin (pAzF). B: Exzitationsspektrum von *E. coli*-Zellsuspensionen gewachsen \pm pAzF. C: Emissionsspektrum von *E. coli*-Zellsuspensionen gewachsen \pm pAzF. ●: ohne pAzF, ○: mit 2 mM pAzF.

Die Expression des Sulfid-Sensors in *E. coli* war nach Optimierung der Expressionsbedingungen erfolgreich. Dabei konnte beobachtet werden, dass das Protein bereits 4 h nach Induktion mittels SDS-Page nachweisbar war (Abb. 3.22 A). Zu diesem Zeitpunkt war jedoch noch keine Fluoreszenz sichtbar. Nach 21 h ist ausreichend Protein gebildet worden, die Kontrolle ohne die unnatürliche Aminosäure pAzF zeigte zu keinem Zeitpunkt Proteinbildung. Nach 21 h wurden Exzitations- und Emissionsspektren der Zellsuspension aufgenommen, deren Maxima von 480 nm im Exzitationsspektrum und 510 nm im Emissionsspektrum, auch mit denen in der Veröffentlichung beschriebenen

übereinstimmten (Abb. 3.22 B, C). Allerdings konnte keine Erhöhung des Fluoreszenzsignals durch Zugabe von Sulfid beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies gelang den Autoren, die dieses System entwickelt hatten, in einzelnen CHO-Zellen (Chen *et al.*, 2012). Auch Modifikationen des Fluoreszenzassays und Messungen mit gereinigtem Protein zeigten keine Änderung des Fluoreszenzsignals (Daten nicht gezeigt). In allen Fällen lag bereits stark fluoreszierendes Protein mit Amin-Gruppe vor. In der Veröffentlichung wurde bereits beschrieben, dass nach Reinigung des Proteins ein Teil davon bereits reduziert vorliegt (Chen *et al.*, 2012). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass bei der Expression, wie sie hier durchgeführt wurde, schon der Großteil der Proteine umgewandelt wurde und deshalb keine zusätzliche Änderung der Fluoreszenz durch Sulfid-Zugabe zu erreichen ist. Das macht das System für das angestrebte Ziel der Visualisierung der Sulfid-Verfügbarkeit und einem eventuellen Screening mittels FACS ungeeignet.

4 Diskussion

4.1 Kontruktion eines plasmidfreien L-Serin-Produktionsstamms

Der industriell genutzte L-Serin-Produktionsstamm enthält zwei Deletionen sowie zusätzlich das Plasmid *pserACB* zur Überexpression der Gene der L-Serin-Synthese (Stolz *et al.*, 2007). Es sollte ein Stammhintergrund geschaffen werden, um auch ohne zusätzliches Plasmid L-Serin bilden zu können, damit für die molekulargenetischen Arbeiten zur weiteren Umwandlung des L-Serins zum L-Cystein verschiedenste Plasmide eingesetzt werden können. Auf dem Plasmid *pserACB* liegt *serA^{fbr}* vor, welches für die feedbackresistente 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase kodiert. Die Deletion der letzten 197 Aminosäuren des Proteins führt zur Feedback-Resistenz (Peters-Wendisch *et al.*, 2002). Eine Sequenzierung der Randbereiche des Gens *serA^{fbr}* ergab, dass die letzten 591 bp des Gens deletiert waren, jedoch der *open reading frame* von *serA* nach der Deletion um 30 bp verlängert ist. Dadurch ist die Sequenz des um 197 Aminosäuren verkürzten *SerA Δ 197* um 10 Aminosäuren verlängert. Die Deletion wurde in dieser Arbeit chromosomal eingebracht und in einem anderen Stamm noch eine zweite Variante ohne die zusätzlichen 30 bp eingefügt. Die Integration der beiden *serA^{fbr}*-Varianten führte zur L-Serin-Bildung von etwa 1,5 mM, was eine Verbesserung im Vergleich zur Kontrolle mit Wildtyp *serA* darstellt, die maximal 0,25 mM L-Serin bildete. Durch Expression der L-Cystein-Synthese-Gene *cysE* und *cysK* zeigten interessanterweise beide Stämme bereits bis zu 1,7 mM L-Cystein-Bildung und damit, dass bereits mit geringen Konzentrationen des Vorläufers L-Serin L-Cystein gebildet werden kann. Die Reduktion der L-Serin-Konzentration im Überstand zum Ende der Kultivierung weist auf eine Verstoffwechselung von ausgeschiedenem L-Serin hin. Für *C. glutamicum* ist die Aufnahme und Verstoffwechselung von L-Serin bekannt (Netzer *et al.*, 2004; Peters-Wendisch *et al.*, 2005). Der Austausch der nativen 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase durch eine feedbackresistente Variante führt zwar zur Bildung von L-Serin, allerdings sind die gebildeten Mengen relativ gering im Vergleich zu den 40 mM, die der *Ser4*-Stamm mit Plasmid-basierter Expression von *serA^{fbr}* zeigt. Aus diesem Grund wurde der Promotor vor *serA^{fbr}* durch den Promotor des Elongationsfaktors TU aus *C. glutamicum* ausgetauscht (*P_{tuf}*). Die Verwendung dieses Promotors führte zu einer Steigerung der *in vitro*-Enzymaktivität um den Faktor zwei bei der Isopropylmalat-Synthase *LeuA* (M. Vogt, persönliche Mitteilung) sowie zur 10-fachen Steigerung der *in vitro*-Aktivität der Fruktose-1,6-Bisphosphatase (Becker *et al.*, 2005) und er wurde auch erfolgreich für die Generierung eines Succinat-Produzenten eingesetzt (Litsanov *et al.*, 2012). Die Konstruktion wurde wie nach dem Vorbild von Litsanov *et al.* (2012) und M. Vogt durchgeführt. Das Wachstum sowie die L-Serin-Bildung der Promotoraustauschmutante waren im Vergleich zum Kontrollstamm reduziert. Dieser überraschende Phänotyp konnte durch die plasmidbasierte Expression von *serA^{fbr}* komplementiert werden, sodass davon auszugehen ist, dass durch die Integration des neuen Promotorbereichs die Expression von *serA* entscheidend gestört ist. Die Transkriptionskontrolle des *serA*-Promotors sowie auch die des *P_{tuf}*-Promotors ist in *C. glutamicum* nicht untersucht. Dies könnte Aufschluss über mögliche Ursachen geben. Möglicherweise ist es ein besserer Ansatz, über einzelne

Punktmutationen im Promotorbereich von *serA* verstärkte Expression zu erreichen, wie es für *ilvD* und *ilvE* (Holatko *et al.*, 2009) sowie *gdh* (Hanssler *et al.*, 2009) in *C. glutamicum* gelang. Weiterhin konnte in dieser Arbeit eindeutig gezeigt werden, dass auch die verstärkte Expression von *serC* und *serB* in Kombination mit *serA*^{fbr} für eine erhöhte L-Serin-Bildung notwendig ist. Somit müsste nicht nur *serA*^{fbr}, sondern auch *serC* und *serB* durch chromosomale Promotormutationen verstärkt exprimiert werden. Die neuen Informationen haben gezeigt, was zur Konstruktion eines plasmidfreien Ser4-Stammhintergrunds mit ausreichender L-Serin-Bildung erforderlich ist und dass dazu umfangreiche molekulargenetische Arbeiten durchgeführt werden müssen.

4.2 L-Cystein-Bildung mit *C. glutamicum*

In *E. coli* bedingen erhöhte Konzentrationen von L-Cystein im Medium eine Wachstumshemmung (Harris, 1981; Sorensen & Pedersen, 1991). Die erhöhte Konzentration führt vermutlich zu oxidativem Stress durch die Bildung von H₂O₂ und Hydroxyl-Radikalen durch die Fenton-Reaktion, welche Proteine und DNA schädigt (Park & Imlay, 2003). In dieser Arbeit zeigte der Wildtyp von *C. glutamicum* eine Reduktion des Wachstums mit zunehmender L-Cystein-Konzentration. Wie neuere Untersuchungen mit *C. glutamicum* zeigen, weist dies auf ein Ungleichgewicht der Thiol-Homöostase hin (Follmann *et al.*, 2009). Allerdings wuchs im Gegensatz zum Wildtyp der L-Serin-Produzent mit zunehmender L-Cystein-Konzentration besser. Diese Verbesserung des Wachstums ging mit einer Abnahme in der L-Serin-Bildung einher. Dieser überraschende Befund ist kaum über negative Effekte erhöhter L-Cystein-Konzentrationen zu erklären. Auch durch den bereits stark veränderten Stammhintergrund um L-Serin-Bildung zu ermöglichen (Wachstum unter Folsäure-Mangel), ist es schwierig, Vergleiche zum Wildtyp zu ziehen. Eine mögliche Erklärung wäre ein regulatorischer Effekt durch die Anwesenheit von L-Cystein. Nach bisherigen Informationen sind weder die Gene der L-Serin-Synthese noch die Gene der Glykolyse Teil des McbR- und CysR-Regulons. Eine erneute Evaluierung der DNA-Mikroarray-Daten von C. Rückert (Rückert *et al.*, 2008) ergab keine Hinweise auf einen Zusammenhang. Es könnte auch sein, dass L-Cystein in noch unbekannter Weise Einfluss auf die Verfügbarkeit von C1-Körpern nimmt und es zu einem Ausgleich der Mangelsituation kommt. Die C1-Körper werden in der Zelle durch den Abbau von L-Serin bereitgestellt (Burkovski, 2008).

Die heterologe Expression feedbackresistenter SATs war ein erster Ansatzpunkt für die Verbesserung der L-Cystein-Synthese, da sowohl für *E. coli* als auch für *C. glutamicum* SAT die *in vitro*-Aktivität in Anwesenheit von L-Cystein deutlich reduziert ist und für beide Enzyme der K_i-Wert im mikromolaren Bereich liegt (Haitani *et al.*, 2006; Kai *et al.*, 2006). Für *E. coli* wurden bereits feedbackresistente SAT-Varianten generiert, die zu einer Verbesserung der L-Cystein-Bildung in *E. coli* und *C. glutamicum* führten (Nakamori *et al.*, 1998; Wada *et al.*, 2002). So konnte mit der Variante EcSAT^{M256I} im *C. glutamicum* Wildtyp die L-Cystein-Bildung von 0,25 mM mit EcSAT^{wt} auf 1 mM erhöht werden (Wada *et al.*, 2002). Zusätzlich wurden bereits feedbackresistente SAT-Varianten von *Arabidopsis thaliana* und *N. tabacum* erfolgreich in *E. coli* exprimiert. Die Expression einer SAT-

Variante aus *N. tabacum* führte zur Bildung von 2,5 mM L-Cystein (Wirtz & Hell, 2003) und die Expression einer SAT-Variante aus *A. thaliana* ergab 14 mM L-Cystein bei gleichzeitiger Reduktion der Cystein-Desulfurase-Aktivität (Takagi *et al.*, 1999). Die Kontrollen mit EcSAT^{wt} bildeten in beiden Fällen kein L-Cystein. In dieser Arbeit führte die Expression der feedbackresistenten Variante EcSAT^{V95R,D96P} nur zu einer minimal erhöhten L-Cystein-Bildung von $1,39 \pm 0,27$ mM im Vergleich zur Kontrolle mit Leervektor ($0,93 \pm 0,16$ mM). Diese Variante wurde aufgrund ihrer *in vitro*-Aktivität und Feedback-Resistenz ausgewählt, allerdings sind keine Untersuchungen *in vivo* durchgeführt worden (Kai *et al.*, 2006). Im Vergleich zu der Mutante EcSAT^{M256I}, welche zuvor in *E. coli* und *C. glutamicum* verwendet wurde und einen K_i von 14,5 μ M hat, weist sie mit einem K_i von 950 μ M eine geringere Sensitivität gegenüber L-Cystein auf. Die Expression des Gens aus *N. tabacum* ergab in *C. glutamicum* keinem Unterschied bezüglich der L-Cystein-Bildung. Es wurden zwar keine Untersuchungen bezüglich der Transkription bzw. Proteinbildung durchgeführt, jedoch lassen sich normalerweise Gene, die in *E. coli* erfolgreich exprimiert werden können, auch in *C. glutamicum* exprimieren. In Pflanzen ist die Ausbildung des CS-Komplexes entscheidend für die Aktivität der SAT (Hell & Wirtz, 2011) und es ist möglich, dass es nicht zu einer Interaktion von NtSAT und OASS aus *C. glutamicum* kommt. Für die Interaktion von SAT und OASS im CS-Komplex spielt der C-Terminus von SAT eine entscheidende Rolle (Bogdanova & Hell, 1997; Mino *et al.*, 1999). Obwohl sich die letzten 10-20 Aminosäuren in Bakterien und Pflanzen stark voneinander unterscheiden, ist das C-terminale Isoleucin stark konserviert und für die Interaktion entscheidend (Campanini *et al.*, 2005; Francois *et al.*, 2006). Sequenzvergleiche zeigen, dass auch SAT aus *C. glutamicum* ein C-terminales Isoleucin aufweist, was ein Indiz für das Vorhandensein eines CS-Komplexes ist. Allerdings wurde auch beschrieben, dass SATs aus unterschiedlichen Organismen mit OASS aus *E. coli* verschiedene Affinitäten für die Ausbildung des CS-Komplexes zeigen (Zhao *et al.*, 2006), sodass eine erfolgreiche Interaktion von SATs aus anderen Organismen in *C. glutamicum* nicht sicher ist. Im Gegensatz zur heterologen Expression feedbackresistenter SATs führte die Expression von *cysE* aus *C. glutamicum* zu einer Verbesserung in der L-Cystein-Bildung von $0,95 \pm 0,35$ mM auf $5,6 \pm 0,8$ mM bzw. $7,3 \pm 0,7$ mM in Kombination mit *cysK*-Expression. Obwohl auch für SAT aus *C. glutamicum* eine starke *in vitro*-Hemmung durch L-Cystein beschrieben ist (Haitani *et al.*, 2006), scheint die Hemmung *in vivo* nicht so wesentlich für die Produktbildung zu sein. Es ist bekannt, dass die Aussagen von *in vitro* erhobenen Daten zur Aktivitätskontrolle bezüglich der Bedeutung für die gesteigerte Produktbildung begrenzt sind, da zum Beispiel auch mit der feedbackregulierten Threonin-Dehydratase aus *C. glutamicum* eine gesteigerte L-Isoleucin-Bildung möglich ist (Morbach *et al.*, 1995). Kristallstrukturanalysen von *E. coli* SAT haben gezeigt, dass L-Cystein im aktiven Zentrum bindet und es eine kompetitive Bindung von L-Serin und L-Cystein gibt (Kai *et al.*, 2006; Pye *et al.*, 2004). Studien mit Proteinen aus *Haemophilus influenza* und *Glycine max* zeigten, dass die Bindung von L-Cystein im aktiven Zentrum zu einer strukturellen Änderung im Protein führt und die Bindeaffinität zum Kofaktor Acetyl-CoA reduziert wird (Kumaran *et al.*, 2009; Olsen *et al.*, 2004). Außerdem führt die Assemblierung des CS-Komplexes zu einer Verringerung der Inhibierung durch L-Cystein und die Bindung von Acetyl-CoA wird verbessert (Kumaran *et al.*, 2009). Die Enzymtests zur Bestimmung der *in vitro*-Aktivität und der Feedback-Hemmung durch L-Cystein in

C. glutamicum wurden mit einer Konzentration von 1 mM L-Serin durchgeführt (Haitani *et al.*, 2006). Da im L-Serin-Produzenten Ser4 jedoch intrazellulär eine hohe L-Serin-Konzentration vorherrscht, ist die Wahrscheinlichkeit der Bindung von L-Serin im aktiven Zentrum im Vergleich zu L-Cystein erhöht und dies könnte zu einer Reduktion der Feedback-Inhibierung *in vivo* führen.

Der Abbau von L-Cystein sollte durch die Deletion von *aecD* verhindert werden. Sowohl für *E. coli* als auch *C. glutamicum* ist bereits der positive Effekt dieser Deletion auf die L-Cystein-Bildung beschrieben worden (Awano *et al.*, 2003; Wada *et al.*, 2002). Die Deletion führte im Ser4-Stammb Hintergrund zu einer Verbesserung der L-Cystein-Bildung von etwa 1 mM auf $3,3 \pm 0,5$ mM. Die gleichzeitige Expression von *cysK* und *cysE* ergab eine Akkumulation von $4,9 \pm 0,8$ mM L-Cystein. Dies war überraschend, da der Stamm Ser4 *pcysKE* ohne *aecD*-Deletion bereits $7,3 \pm 0,7$ mM L-Cystein bildete. Dieser Effekt ist unklar. Er könnte mit dem beobachteten intrazellulären Anstau von L-Cystathionin als Konsequenz der *aecD*-Deletion zusammenhängen, müsste dann aber *pcysKE*-spezifisch sein. L-Cystathionin ist für den Wildtyp von *C. glutamicum* jedoch nicht toxisch, da dieser in Anwesenheit von 10 mM L-Cystathionin kein verändertes Wachstum zeigt (Follmann *et al.*, 2009). Der Anstau von L-Cystathionin in Ser4 Δ *aecD* sollte durch die Deletion von *metB* verhindert werden (s. Abb. 1.1). Dadurch kann OAH nicht weiter zu L-Cystathionin verstoffwechselt werden, die Bereitstellung von L-Homocystein für die L-Methionin-Bildung ist durch den Weg der direkten Sulfhydrylierung von OAH jedoch weiterhin gegeben (Hwang *et al.*, 2002). Die Deletion von *metB* in Ser4 Δ *aecD* führte jedoch zu einer starken Reduktion des Wachstums und der Stamm war in seiner Fähigkeit L-Cystein und L-Serin zu bilden stark gestört. Das ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass der Stamm Ser4 durch das Wachstum unter Folsäure-Mangel und die daraus resultierende eingeschränkte Bereitstellung von C1-Körpern für die L-Methionin-Bildung bereits unter einem L-Methionin-Mangel leidet. Die logische Konsequenz daraus war das Ausschalten der kompletten L-Methionin-Synthese durch die Deletion von *metX* (Rückert *et al.*, 2003). Diese Deletion ergab die zu erwartende L-Methionin-Auxotrophie in Ser4 sowie Ser4 Δ *aecD* und das Wachstum konnte durch Supplementation mit L-Methionin wiederhergestellt werden. Die Deletion zeigte keinen Einfluss auf das Wachstum, wenn L-Methionin supplementiert wurde, und die Stämme waren in der Lage L-Cystein zu akkumulieren. L-Serin wurde auch gebildet, dessen Konzentration war aber bei Expression durch *cysE* und *cysK* stark vermindert. Die gebildete L-Cystein-Menge war geringer als in dem Experiment mit Ser4 pEKEx2 und Ser4 *pcysKE*, sodass das Ausschalten der L-Methionin-Synthese keine geeignete Strategie zur Verbesserung der L-Cystein-Bildung zu sein scheint. Neben der Umgehung des L-Cystathionin-Anstaus durch die Deletion von Genen der L-Methionin-Synthese könnte das Ausschalten von Proteinen mit Cystein-Desulfurase-Aktivität eine weitere Option sein. Es sind noch drei weitere Enzyme in *C. glutamicum* bekannt, die als Cystein-Desulfurase fungieren können und für zwei dieser Enzyme wurde bereits die entsprechende Aktivität *in vitro* nachgewiesen (Marienhagen *et al.*, 2005). Aus Sequenzvergleichen geht hervor, dass diese wahrscheinlich an der Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern beteiligt sind. Ob eine Deletion der entsprechenden Gene für die L-Cystein-Bildung von Vorteil ist, müsste experimentell untersucht werden.

Da die Expression von *cysE* in Ser4 bereits erste Erfolge gebracht hatte und die Ergebnisse darauf schließen lassen, dass die Aufhebung der Feedback-Inhibierung dieses Enzyms nicht vorrangig ist, um extrazelluläre Akkumulation von L-Cystein zu erreichen, sollte die Versorgung der Zellen mit Schwefel verbessert werden. Metabolomanalysen mit *E. coli* L-Cystein-Produktionsstämmen haben die Schwefel-Verfügbarkeit als einen Engpass für gesteigerte L-Cystein-Produktion identifiziert (Wichter, 2011). In dieser Arbeit wurde das Reduktionsoperon *fpr2-cysIXHDNYZ* aus *C. glutamicum* kloniert, das für die meisten an der assimilatorischen Sulfat-Reduktion beteiligten Gene kodiert. Die Verwendung eines Vektors mit geringer Kopienzahl erschien geeignet, da die Schwefel-Aufnahme und -Reduktion zum einen die Expression von acht zusätzlichen Genen benötigt und zum anderen das dabei entstehende Sulfid für die Zellen toxisch ist (Rückert *et al.*, 2005). Das Einbringen des Operons in die Stämme führte zu einer starken Verminderung des Wachstums und der Produktbildung. Interessanterweise zeigten die Kulturen, die das Reduktionsoperon exprimierten, eine rötliche Färbung. Da die Sulfit-Reduktase CysI vermutlich Sirohäm als Kofaktor benötigt, ist dies Indiz für eine vermehrte Bildung von Sirohäm. In *E. coli* wird Sirohäm durch das Multi-Domänen-Protein CysG in drei Schritten von Uroporphyrinogen-III aus gebildet (Spencer *et al.*, 1993). Die Synthese in *C. glutamicum* läuft jedoch wahrscheinlich eher wie in *Bacillus megaterium* ab, wo drei Proteine die Sirohäm-Bildung katalysieren (Raux *et al.*, 2003). Sequenzvergleiche haben gezeigt, dass CysY, dessen Gen Teil des Reduktionsoperons ist, große Ähnlichkeit mit einer Sirohydrochlorin-Ferrochelatase aufweist und CysG mit einer Uroporphyrinogen-III-Synthetase (Rückert *et al.*, 2005). Ob noch ein drittes Protein an der Synthese beteiligt ist oder CysG die ersten beiden Schritte der Sirohäm-Synthese katalysiert, ist allerdings nicht bekannt. Mittels Differenzspektroskopie wurde versucht, Sirohäm nachzuweisen, dieses gelang aber nicht. Vermutlich wird das Signal durch die Häme der Cytochrome aus der Atmungskette überlagert. Die Auswirkung der Expression auf das Wachstum und die Produktbildung kann verschiedenste Gründe haben. So könnte z. B. die Bildung der Proteine für die Zelle einen zusätzlichen Stressfaktor darstellen. Zusätzlich könnte die Akkumulierung des toxischen Sulfids, welches durch die Zelle nicht schnell genug verstoffwechselt wird, zu einem weiteren Stress führen. Da für die Reduktion von Sulfat zu Sulfid zusätzliche NADPH, ATP, GTP und Thioredoxin benötigt wird, wäre auch vorstellbar, dass die Expression des Reduktionsoperons auch zu einem Ungleichgewicht im Energiehaushalt der Zellen führt. Da OAS in Ser4 und Ser4 Δ *aecD* in erhöhter Konzentration vorliegt, kann die Reduktion von Sulfat zu Sulfid bei der L-Cystein-Bildung als limitierender Faktor gewertet werden. In *E. coli* kann dieses Problem durch die Expression von *cysM* und die gleichzeitige Zugabe von Thiosulfat umgangen werden. Bei der von CysM katalysierten Reaktion von OAS und Thiosulfat entsteht S-Sulfocystein, welches von den Glutaredoxinen (Grx) NrdH und Grx1 zu L-Cystein reduziert wird (Nakatani *et al.*, 2012). *C. glutamicum* besitzt zwar kein CysM (Burkovski, 2008), kann allerdings trotzdem auf Thiosulfat wachsen (Rückert *et al.*, 2005). Für *C. glutamicum* ist NCgl2445 als Grx-ähnliches Protein annotiert. Somit wären zukünftig interessante Ansatzpunkte zu untersuchen, ob *C. glutamicum* *in vivo* S-Sulfocystein zu L-Cystein reduzieren kann und bei gleichzeitiger Expression von *cysM* aus *E. coli* die direkte Verwertung von Thiosulfat ermöglicht wird.

Metabolomanalysen mit *E. coli* L-Cystein-Produktionsstämmen haben auch die Verfügbarkeit der Vorstufen aus der Glykolyse und des L-Serin-Stoffwechsels als Engpässe für die L-Cystein-Produktion identifiziert (Wichter, 2011). Das ist zwar in *C. glutamicum* durch die Verwendung des L-Serin-Produzenten Ser4 nicht gegeben, allerdings ist es erstaunlich, dass die Synthese von L-Serin durch die Anwesenheit von L-Cystein deutlich reduziert wird. Bisher wurden alle Daten bezüglich der Regulation von McbR und CysR im Wildtyp Hintergrund mit Deletionen der entsprechenden Regulatoren gewonnen. Für diese Stämme waren jedoch keine Gene für die L-Serin-Bildung bzw. Glykolyse in der Transkription beeinflusst (Rey *et al.*, 2005; Rey *et al.*, 2003; Rückert *et al.*, 2008). Allerdings herrschen beim L-Serin-Produzenten durch die starke Folsäure-Limitation extrem andere Bedingungen, sodass regulatorische Effekte nicht ausgeschlossen werden können.

Insgesamt konnte die L-Cystein-Bildung mit *C. glutamicum* im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Konzentrationen von 2,4 mM auf 7,3 mM verbessert werden (Wada *et al.*, 2002). Allerdings bleiben diese Werte noch deutlich hinter dem Wert von 14 mM zurück, der für *E. coli* beschrieben ist (Takagi *et al.*, 1999). Außerdem zeigte sich, dass die molekulargenetischen Arbeiten, die auf dem Stamm Ser4 *pcysKE* basierten, keine weiteren Verbesserungen der L-Cystein-Bildung nach sich zogen. Neben einer möglichen Limitierung der Schwefel-Versorgung sowie geringen Aktivitäten von CysK und CysE kommt auch ein limitierender Export von gebildetem L-Cystein aus der Zelle in Frage. Über den Export von L-Cystein in *C. glutamicum* ist noch nichts bekannt. In *E. coli* dagegen wurden bereits die L-Cystein-Exporter YdeD und YfiK identifiziert (Dassler *et al.*, 2000; Franke *et al.*, 2003) und es konnte gezeigt werden, dass beide Transporter sowohl OAS als auch L-Cystein exportieren (Franke *et al.*, 2003). Weitere beteiligte Exporter in *E. coli* werden durch *cydDC* und *bcr* kodiert. CydDC exportiert L-Cystein ATP-abhängig ins Periplasma, ist für die Assemblierung von Cytochrom *bc* sowie der periplasmatischen Cytochrome zuständig und scheint für die Redox-Homöostase im Periplasma eine wichtige Rolle zu spielen (Pittman *et al.*, 2002). Der Transporter Bcr, der eine Resistenz gegen Bicyclomycin, Tetrazyklin und Sulfathiazol vermittelt, ist auch in der Lage, L-Cystein zu exportieren (Yamada *et al.*, 2006).

4.3 Entwicklung von Biosensoren zur intrazellulären Detektion der Metabolite *O*-Acetyl-L-Serin und *O*-Acetyl-L-Homoserin in *C. glutamicum*

OAS und OAH sind Schlüsselmetabolite im Schwefel-Metabolismus von *C. glutamicum*, da sie die Schwefel-Akzeptor-Moleküle bei der Synthese von L-Cystein und L-Methionin darstellen. Ist kein Schwefel für den Einbau vorhanden, akkumulieren sie und dienen als Effektoren für den Transkriptionsregulator CysR, welcher als Antwort die Transkription der Gene für die assimilatorische Sulfat-Aufnahme und –Reduktion aktiviert. Die Konstruktion der Metabolitsensoren erfolgte nach dem Vorbild von pSenLys, einem Sensor für L-Lysin (Binder *et al.*, 2012). Als Promotorregionen vor dem Reportergen *eyfp* wurde zum einen die Region vor *cysI* ausgewählt, von der bereits experimentell durch *in vitro*-Analysen gezeigt wurde, dass sie eine CysR-Bindestelle enthält (Rückert *et al.*, 2008). Jedoch findet sich vor *cysI* auch eine Bindestelle für den Repressor McbR, weshalb eine zweite Variante mit dem Promotorbereich von NCgl1289 konstruiert wurde. Die CysR-Bindestelle im

Promotorbereich vor NCgl1289 wurde mithilfe von *in silico*-Analysen identifiziert und enthält keine McbR-Bindestelle (Rückert *et al.*, 2008). Die resultierenden Plasmide pSenOAS1 und pSenOAS3, die jeweils die CysR-Bindestellen von NCgl1289 bzw. *cysI* enthielten, wurden nach Konstruktion auf OAS-spezifische und OAH-spezifische Fluoreszenz getestet. Die OAS-spezifische Fluoreszenz wurde mithilfe der Stämme Ser4 und Ser4 Δ *aecD* getestet, die abgestufte Bildung von L-Cystein zeigten. Die BioLector-Kultivierung ergab für beide Sensorvarianten sowohl für Ser4 als auch für Ser4 Δ *aecD* eine erhöhte spezifische Fluoreszenz im Vergleich zum Wildtyp, der kein L-Cystein bildet. Somit konnte das Vorhandensein beider Bindestellen *in vivo* bestätigt werden. Die spezifische Fluoreszenz war für Ser4 Δ *aecD* im Vergleich zu Ser4 erhöht und mit zunehmender spezifischer Fluoreszenz konnte eine Zunahme der intrazellulären OAS-Konzentration beobachtet werden. Im Gegensatz zu *E. coli*, wo der Regulator der assimilatorischen Sulfat-Reduktion in Anwesenheit des OAS-Derivats *N*-Acetyl-L-Serin an die DNA bindet (Kredich, 1996), ist hiermit gezeigt worden, dass in *C. glutamicum* OAS der *in vivo*-Effektor für die Interaktion von CysR mit der DNA ist. Interessanterweise war die Grundfluoreszenz von pSenOAS1 im Vergleich zu pSenOAS3 deutlich höher. Das kann zum einen durch eine unterschiedliche Promotorstärke erklärt werden, zum anderen aber auch dadurch, dass bei pSenOAS3 zusätzlich noch die McbR-Bindestelle vorliegt und die beiden Regulatoren einen antagonistischen Effekt auf die Transkription haben (Rey *et al.*, 2005; Rückert *et al.*, 2008). Möglicherweise erklärt der antagonistische Effekt auch die Heterogenität der Kulturen mit pSenOAS3 bezüglich der Fluoreszenz auf Einzelzellebene. Die beiden Sensorkonstrukte zeigten zudem einen unterschiedlichen Einfluss auf die L-Cystein-Bildung. So konnte für pSenOAS1 eine Zunahme in der L-Cystein-Bildung sowohl für Ser4 als auch Ser4 Δ *aecD* beobachtet werden, wohingegen mit pSenOAS3 die L-Cystein-Bildung für Ser4 reduziert war und für Ser4 Δ *aecD* erhöhte Konzentrationen vorlagen. Da sich die beiden Sensorkonstrukte nur in ihrer CysR-Binderegion vor *eyfp* unterscheiden, sind die Gründe für die unterschiedlichen Effekte hier zu suchen. Durch die zusätzliche McbR-Bindestelle vor *cysI* auf pSenOAS3 könnte es zur Austitrierung von McbR durch die Plasmidkopien in den Zellen kommen, was gleichzeitig zu einer erhöhten Verfügbarkeit an freiem CysR-Regulator führt, der mit der chromosomalen DNA interagieren kann.

Neben der Interaktion von OAS mit CysR ist auch die *in vitro*-Interaktion von OAH und CysR beschrieben (Rückert *et al.*, 2008). Für die Untersuchung der *in vivo*-Interaktion von OAH und CysR wurde ein Testsystem entwickelt, welches auf dem *C. glutamicum* Stamm KK42 aufbaut. Dieser Stamm wurde ausgesucht, weil er einen erhöhten Metabolitfluss in Richtung L-Threonin aufweist (Morbach *et al.*, 1996) und OAH wie L-Threonin von L-Homoserin aus gebildet wird. Für die graduelle intrazelluläre Bildung von OAH wurde *metX* mithilfe des ATC-induzierbaren Vektors pCLTON2 in den Stämmen KK42 pSenOAS1 und KK42 pSenOAS3 exprimiert. Für den Vektor pCLTON2 ist eine stringente Kontrolle der Genexpression beschrieben (Lausberg *et al.*, 2012), was auch in dieser Arbeit beobachtet wurde, da sowohl Wachstum als auch spezifische Fluoreszenz der nicht-induzierten pCLTON2*metX*-Derivate im Vergleich zum Leerplasmid nahezu identisch waren. Die graduelle Expression von *metX* führte zu einer graduellen Reduktion des Wachstums, die vermutlich auf die Expression oder die Aktivität der Homoserin-Acetyltransferase MetX

zurückzuführen ist, aber gleichzeitig auch zu einer zunehmenden spezifischen Fluoreszenz führte. Dabei war, wie bereits in den Experimenten zur OAS-abhängigen Fluoreszenz gezeigt, die Grundfluoreszenz für die Stämme mit pSenOAS1 im Vergleich zu pSenOAS3 deutlich erhöht. Die Zunahme in der spezifischen Fluoreszenz war auch für pSenOAS3 höher, was vermutlich an unterschiedlicher Promotorstärke oder aber auch am Vorhandensein von CysR und McbR-Bindestellen in pSenOAS3 liegt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sich die intrazelluläre Konzentration von OAH durch Expression von *metX* erhöht und somit mit der Zunahme der spezifischen Fluoreszenz korreliert. Die OAH-Konzentrationen, die hier gemessen wurden, sind im Vergleich zu Messungen, die mit *C. glutamicum* Wildtyp durchgeführt worden sind, um Faktor 10 erhöht (Bolten *et al.*, 2010). Die Tatsache, dass in den Stämmen OAH akkumuliert, lässt darauf schließen, dass die nachfolgenden Schritte der L-Methionin-Synthese wie die Schwefel-Verfügbarkeit, aber auch die Bereitstellung von C1-Körpern limitierend sind.

Um die konstruierten Sensoren auf Eignung zum Test von intrazellulärem Schwefel-Mangel zu untersuchen, wurde der Wildtyp mit pSenOAS1 und pSenOAS3 mit verschiedenen Sulfat-Konzentrationen kultiviert. Über einer Konzentration von 1 mM Sulfat waren die Stämme im verwendeten Medium nicht mehr im Wachstum begrenzt. Bei einer Konzentration von 400 μ M und mit weiter abnehmender Sulfat-Konzentration im Medium war eine Abnahme des Wachstums zu beobachten. Gleichzeitig wurde die Zunahme der spezifischen Fluoreszenz sichtbar. Dabei war wiederum die Grundfluoreszenz für pSenOAS1 am höchsten, die Zunahme der spezifischen Fluoreszenz aber für pSenOAS3 stärker. Sowohl die Wachstumskurven als auch Kurven für die spezifische Fluoreszenz unterschieden sich von denen des Wildtyps aus den Untersuchungen zur OAS-spezifischen Fluoreszenz. Das liegt womöglich daran, dass hier mit unterschiedlichen Medien gearbeitet wurde. Während normalerweise alle Wachstumsversuche im Standardminimalmedium CGXII stattgefunden haben, wurde hier das schwefelfreie Medium MMES verwendet. Die signifikante Antwort der Fluoreszenz weist auf eine Akkumulierung der Metabolite OAS und OAH hin, wenn Schwefel limitierend wird. Allerdings kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob beide Metabolite gleichermaßen angestaut werden. Die Konsequenzen von Schwefel-Verfügbarkeit sind in den meisten Studien üblicherweise auf Transkriptions- oder Proteinebene untersucht so z. B. für *Pseudomonas aeruginosa* (Quadroni *et al.*, 1999; Tralau *et al.*, 2007), *M. tuberculosis* (Hatzios & Bertozzi, 2011; Mehaffy *et al.*, 2010; Pinto *et al.*, 2004) und *E. coli* (Gyaneshwar *et al.*, 2005). Mittels Metabolitsensoren können nun Erkenntnisse auch auf Metabolitebene und *in vivo* gewonnen werden, was zum Beispiel für Studien im natürlichen Habitat bei pathogenen Mikroorganismen von Interesse sein könnte.

4.4 Untersuchungen zum Einfluss des Regulators CysR auf die L-Cystein-Produktion

Die Ergebnisse aus den Versuchen bezüglich des OAS-Biosensors haben ergeben, dass die Expression des Regulators CysR einen positiven Effekt auf die L-Cystein-Bildung hat. Das konnte für den Stamm Ser4 Δ *aecD* mit beiden Sensorkonstrukten nachgewiesen werden, wohingegen der Stamm Ser4 nur mit pSenOAS1 eine leicht erhöhte L-Cystein-Bildung

zeigte und sich pSenOAS3 negativ auf die Produktbildung auswirkte. *cysR* wurde losgelöst von der Sensorkassette exprimiert und sowohl unter die Kontrolle von P_{tac} als auch P_{cysR} gestellt. Durch die zusätzliche McbR-Bindestelle vor *cysI* auf pSenOAS3 kann es zur Austitrierung des Regulators McbR durch die Plasmidkopien in den Zellen kommen. Eine zusätzliche CysR-Bindestelle auf dem Plasmid führt zu weniger freiem CysR-Regulator, der mit der chromosomalen DNA interagieren kann. Die Ergebnisse zeigen, dass die Regulation der Schwefel-Homöostase komplex ist und dass eine fein abgestimmte Konzentration der Regulatoren wichtig zu sein scheint.

Mittlerweile sind bereits viele Transkriptionsregulatoren für *C. glutamicum* bekannt und die Koregulation von Genen durch verschiedene Transkriptionsfaktoren ist ein maßgebendes Prinzip im regulatorischen Netzwerk von *C. glutamicum* (Schröder & Tauch, 2010). Zusätzlich werden die Regulatoren in Anlehnung an die Anzahl der regulierten Gene hierarchisch angeordnet. So gibt es globale Regulatoren, Masterregulatoren und lokale Regulatoren (Brinkrolf *et al.*, 2010), die im Zusammenspiel eine Feinabstimmung der Genexpression in funktionalen Modulen ermöglichen (Kohl & Tauch, 2009). Diese Art des regulatorischen Netzwerks dient in Bezug auf den Schwefel-Metabolismus der strikten Regulation, sodass eine Akkumulation des toxischen Sulfids in den Zellen verhindert wird (Schröder & Tauch, 2010). Dabei wurde McbR als Masterregulator identifiziert (Rey *et al.*, 2005), wohingegen CysR und SsuR lokale Regulatoren sind (Koch *et al.*, 2005a; Rückert *et al.*, 2008; Schröder & Tauch, 2010). Da der Stamm Ser4 und auch sein Derivat Ser4 Δ *aecD* sehr wahrscheinlich unter einem L-Methionin-Mangel leiden, sind möglicherweise auch nicht genug Effektoren für McbR vorhanden, um diesen zu inaktivieren. Es muss jedoch auch bedacht werden, dass dieser Stammhintergrund genetisch bereits stark verändert ist und die Kultivierungen zur Produktbildung immer unter starkem C1-Mangel erfolgen, sodass es wie bereits erwähnt unmöglich wird, Vergleiche mit der Wildtypsituation anzustellen.

Für *E. coli* wurde zwar beschrieben, dass die erhöhte Expression des Regulators CysB zu einer Verbesserung der L-Cystein-Bildung führt (Maier & Winterhalter, 2001), allerdings gibt es hier keine Koregulation des CysB-Regulons durch die Regulatoren des L-Methionin-Stoffwechsels, MetJ und MetR. Die unterschiedliche Ausbildung des Transkriptionsnetzwerks ist möglicherweise dadurch bedingt, dass *E. coli* L-Methionin nur mithilfe der Transsulfurierung bilden kann und der direkte Einbau von Sulfid somit nur über L-Cystein möglich ist (Greene, 1996; Kredich, 1996). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist die Übertragung dieser Strategie zur Verbesserung der L-Cystein-Bildung von *C. glutamicum* nicht ohne weiteres möglich. Die Koregulation des CysR-Regulons durch McbR sollte theoretisch durch dessen Deletion möglich sein. Jedoch führte die Deletion von *mcbR* in *C. glutamicum* und damit die konstitutive Transkription des McbR-Regulons zu einer starken Reduktion des Wachstums sowie zur starken intrazellulären Akkumulation von L-Homolanthionin, welches bei einer Nebenreaktion von MetB entsteht (Krömer *et al.*, 2006). Dies bestätigt, dass vollständige Deletion oder Expression eines Regulators nicht geeignet ist, um die Komplexe Regulation des Schwefel-Metabolismus an erhöhte Produktbildung anzupassen.

4.5 Sulfid-Sensor *E. coli*

Zu den entwickelten OAS- und OAH-Metabolitsensoren, die die Verfügbarkeit von Sulfid indirekt wahrnehmen können, wäre die direkte Detektion von Sulfid mithilfe des von Chen et al. (2012) entwickelten Sulfid-Sensors eine gute Ergänzung. Der Sulfid-Sensor besteht aus einer zirkulär permutierten GFP-Variante (cpGFP), deren Chromophor die unnatürliche Aminosäure *p*-Azidophenylalanin (pAzF) enthält und durch chemische Reaktion mit Sulfid verstärkte Fluoreszenz zeigt. Die Charakterisierung des in *E. coli* gebildeten cpGFPs erfolgte *in vitro*, wurde jedoch auch *in vivo* in CHO-Zellen erfolgreich getestet. Es war das Ziel zu prüfen, ob mit diesem System auch in *E. coli in vivo* die intrazelluläre Sulfid-Verfügbarkeit visualisiert werden kann, um den Weg für eine mögliche Anwendung in *C. glutamicum* zu ebnen. Die Expression des Sulfid-Sensors in *E. coli* war nach Optimierung der Expressionsbedingungen erfolgreich. Die Exzitations- und Emissionsspektren sowohl mit Zellsuspensionen als auch mit gereinigtem Protein stimmten mit denen in der Veröffentlichung gezeigten überein. Es war jedoch weder *in vivo* noch *in vitro* möglich eine Erhöhung der Fluoreszenz durch Zugabe von Sulfid zu erreichen und es lag bereits immer stark fluoreszierendes Protein vor. Bei Chen et al. (2012) wurde beschrieben, dass ein Teil des Proteins direkt nach der Reinigung bereits in reduzierter Form vorliegt. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass bereits während der Expression des Sulfid-Sensors oder bei der Reinigung des Proteins, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt worden sind, ein Großteil der Proteine reduziert wurde. Dadurch ist dieses System für die Visualisierung von intrazellulärer Sulfid-Verfügbarkeit und einem eventuellen Screening mittels FACS ungeeignet. Dennoch bieten die hier vorgestellten Prinzipien ein großes Potential, das Repertoire an Metabolitsensoren zu erweitern und die Eigenschaften von Fluoreszenzproteinen zu verändern. Die zirkuläre Permutation von Fluoreszenzproteinen ermöglicht z. B. die Generierung neuer Sensor-Varianten durch die Fusion anderer Proteindomänen, wie z. B. die Fusion von Calmodulin an cpGFP und den damit entstandenen Ca^{2+} -Sensor (Baird et al., 1999). Die Weiterentwicklung dieses Sensors führte zu einer Verbesserung in der Sensitivität, aber auch zur Veränderung in den Eigenschaften, wie z. B. die Verschiebung der Exzitationswellenlänge nach Bindung von Ca^{2+} (Nagai et al., 2001). Weiterhin konnte die Spezifität erweitert werden, sodass auch andere Metallionen wie Cu^{2+} , Zn^{2+} und Ni^{2+} detektiert werden können (Mizuno et al., 2007). Auch der Einbau unnatürlicher Aminosäuren bietet neue Möglichkeiten zur Veränderung der Eigenschaften von Fluoreszenzproteinen (Young et al., 2010). So wurde z. B. ein H_2O_2 -Sensor entwickelt (Wang et al., 2012).

4.6 Ausblick

Zusammengefasst ist es in dieser Arbeit gelungen, die L-Cystein-Produktion in *C. glutamicum* zu verbessern. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass sich die Verbesserung der L-Cystein-Produktion aufgrund der komplexen Regulation des Schwefel-Stoffwechsels als schwierig erwies und ein rationaler Ansatz zur Generierung eines L-Cystein-Produzenten möglicherweise im Vergleich zu klassischer Mutagenese von Nachteil ist. Die Kombination von klassischer Mutagenese mit Hochdurchsatz-Screenings, die sich optische Metabolitsensoren zunutze machen, ist hierbei eine Perspektive für die Generierung von Produktionsstämmen. Neben dieser Anwendung ermöglichen

Metabolitsensoren auch *in vivo*-Analysen auf molekularer Ebene, wie es in dieser Arbeit für die Verfügbarkeit der Metabolite OAS und OAH unter Schwefel-Mangel gezeigt werden konnte, und erweisen sich als sinnvolles Hilfsmittel für das Verständnis zellulärer Prozesse.

Literaturverzeichnis

- Abe, S, Takayama, K-I, Kinoshita, S (1967).** Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 13, 279-301.
- Alderwick, LJ, Birch, HL, Mishra, AK, Eggeling, L, Besra, GS (2007).** Structure, function and biosynthesis of the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall: arabinogalactan and lipoarabinomannan assembly with a view to discovering new drug targets. *Biochemical Society transactions*. 35, 1325-8.
- Awano, N, Wada, M, Kohdoh, A, Oikawa, T, Takagi, H, Nakamori, S (2003).** Effect of cysteine desulphhydrase gene disruption on L-cysteine overproduction in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 62, 239-43.
- Baird, GS, Zacharias, DA, Tsien, RY (1999).** Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96, 11241-6.
- Becker, J, Klopprogge, C, Zelder, O, Heinzle, E, Wittmann, C (2005).** Amplified expression of fructose 1,6-bisphosphatase in *Corynebacterium glutamicum* increases in vivo flux through the pentose phosphate pathway and lysine production on different carbon sources. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 8587-8596.
- Becker, J, Wittmann, C (2012a).** Bio-based production of chemicals, materials and fuels - *Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory. *Current opinion in biotechnology*. 23, 631-40.
- Becker, J, Wittmann, C (2012b).** Systems and synthetic metabolic engineering for amino acid production - the heartbeat of industrial strain development. *Current opinion in biotechnology*. 23, 718-26.
- Bermejo, C, Ewald, JC, Lanquar, V, Jones, AM, Frommer, WB (2011).** *In vivo* biochemistry: quantifying ion and metabolite levels in individual cells or cultures of yeast. *Biochemical Journal*. 438, 1-10.
- Bhowruth, V, Alderwick, LJ, Brown, AK, Bhatt, A, Besra, GS (2008).** Tuberculosis: a balanced diet of lipids and carbohydrates. *Biochemical Society transactions*. 36, 555-65.
- Binder, S, Schendzielorz, G, Stäbler, N, Krumbach, K, Hoffmann, K, Bott, M, Eggeling, L (2012).** A high-throughput approach to identify genomic variants of bacterial metabolite producers at the single-cell level. *Genome biology*. 13, R40.
- Birnboim, HC, Doly, J (1979).** Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 7, 1513-1523.
- Bogdanova, N, Hell, R (1997).** Cysteine synthesis in plants: Protein-protein interactions of serine acetyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 11, 251-262.
- Bolten, CJ, Schröder, H, Dickschat, J, Wittmann, C (2010).** Towards methionine overproduction in *Corynebacterium glutamicum* - methanethiol and dimethyldisulfide as reduced sulfur sources. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20, 1196-1203.
- Bradford, MM (1976).** Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
- Brinkrolf, K, Schröder, J, Pühler, A, Tauch, A (2010).** The transcriptional regulatory repertoire of *Corynebacterium glutamicum*: Reconstruction of the network controlling pathways involved in lysine and glutamate production. *J Biotechnol*. 149, 173-82.
- Brune, I, Brinkrolf, K, Kalinowski, J, Pühler, A, Tauch, A (2005).** The individual and common repertoire of DNA-binding transcriptional regulators of *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium jeikeium* deduced from the complete genome sequences. *Bmc Genomics*. 6.
- Burkovski, A (2008).** *Corynebacteria : genomics and molecular biology*. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Campanini, B, Speroni, F, Salsi, E, Cook, PF, Roderick, SL, Huang, B, Bettati, S, Mozzarelli, A (2005).** Interaction of serine acetyltransferase with O-acetylserine sulfhydrylase active site: evidence from fluorescence spectroscopy. *Protein Sci*. 14, 2115-24.

- Chen, S, Chen, Z-J, Ren, W, Ai, H-W (2012). Reaction-Based Genetically Encoded Fluorescent Hydrogen Sulfide Sensors. *Journal of the American Chemical Society*. 134, 9589-9592.
- Colyer, TE, Kredich, NM (1996). *In vitro* characterization of constitutive CysB proteins from *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol*. 21, 247-56.
- Cremer, J, Eggeling, L, Sahm, H (1990). Cloning the *dapA-dapB* cluster of the lysine-secreting bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Molecular and General Genetics*. 220, 478-480.
- Dassler, T, Maier, T, Winterhalter, C, Böck, A (2000). Identification of a major facilitator protein from *Escherichia coli* involved in efflux of metabolites of the cysteine pathway. *Molecular Microbiology*. 36, 1101-1112.
- Desai, SK, Gallivan, JP (2004). Genetic screens and selections for small molecules based on a synthetic riboswitch that activates protein translation. *Journal of the American Chemical Society*. 126, 13247-13254.
- Dietrich, JA, McKee, AE, Keasling, JD (2010). High-Throughput Metabolic Engineering: Advances in Small-Molecule Screening and Selection. *Annual Review of Biochemistry*, Vol 79. 79, 563-590.
- Eggeling, L, Sahm, H (1999). L-Glutamate and L-lysine: traditional products with impetuous developments. *Applied microbiology and biotechnology*. 52, 146-153.
- Eikmanns, BJ, Kleinertz, E, Liebl, W, Sahm, H (1991). A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene*. 102, 93-8.
- Ewald, JC, Reich, S, Baumann, S, Frommer, WB, Zamboni, N (2011). Engineering genetically encoded nanosensors for real-time in vivo measurements of citrate concentrations. *PloS one*. 6, e28245.
- Follmann, M, Ochrombel, I, Kramer, R, Trotschel, C, Poetsch, A, Rückert, C, Huser, A, Persicke, M, Seiferling, D, Kalinowski, J, Marin, K (2009). Functional genomics of pH homeostasis in *Corynebacterium glutamicum* revealed novel links between pH response, oxidative stress, iron homeostasis and methionine synthesis. *Bmc Genomics*. 10, 23.
- Francois, JA, Kumaran, S, Jez, JM (2006). Structural basis for interaction of O-acetylserine sulphydrylase and serine acetyltransferase in the *Arabidopsis* cysteine synthase complex. *Plant Cell*. 18, 3647-55.
- Franke, I, Resch, A, Dassler, T, Maier, T, Böck, A (2003). YfiK from *Escherichia coli* promotes export of O-acetylserine and cysteine. *Journal of Bacteriology*. 185, 1161-1166.
- Gaits, F, Hahn, K (2003). Shedding Light on Cell Signaling: Interpretation of FRET Biosensors. *Science Signaling*. 2003, pe3.
- Gao, B, Gupta, RS (2012). Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR. 76, 66-112.
- Grant, SG, Jessee, J, Bloom, FR, Hanahan, D (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87, 4645-9.
- Gredell, JA, Frei, CS, Cirino, PC (2012). Protein and RNA engineering to customize microbial molecular reporting. *Biotechnology journal*. 7, 477-99.
- Greene, RC (1996). Biosynthesis of methionine. *Escherichia coli* and *Salmonella*. 542-560.
- Gutmann, M (1993). Glutamatsekretion bei *Corynebacterium glutamicum*: Mechanismus und Bedeutung des Carrier-vermittelten Transports. Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Gyaneshwar, P, Paliy, O, McAuliffe, J, Popham, DL, Jordan, MI, Kustu, S (2005). Sulfur and nitrogen limitation in *Escherichia coli* K-12: specific homeostatic responses. *J Bacteriol*. 187, 1074-90.
- Haas, T, Kircher, M, Kohler, T, Wich, G, Schorken, U, Hagen, R (2009). White Biotechnology. Sustainable Solutions for Modern Economies. The Royal Society of Chemistry, 436-478.

- Haitani, Y, Awano, N, Yamazaki, M, Wada, M, Nakamori, S, Takagi, H (2006). Functional analysis of L-serine O-acetyltransferase from *Corynebacterium glutamicum*. *Fems Microbiology Letters*. 255, 156-163.
- Hanahan, D (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*. 166, 557-580.
- Hanahan, D (1985). Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In: Glover, DM (Ed.), DNA Cloning, Vol. 1. A Practical Approach. Irl Press, Oxford/ Washington, DC, 109-136.
- Hanssler, E, Müller, T, Palumbo, K, Patek, M, Brocker, M, Krämer, R, Burkovski, A (2009). A game with many players: control of *gdh* transcription in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol*. 142, 114-22.
- Harinder, K, Bains, GS (1988). Studies on baking of high alpha-amylase flours: effect of pH, salt and L-cysteine . HCl in the dough. *Food / Nahrung*. 32, 481-490.
- Harris, CL (1981). Cysteine and growth inhibition of *Escherichia coli* - threonine deaminase as the target enzyme. *Journal of bacteriology*. 145, 1031-1035.
- Hatzios, SK, Bertozzi, CR (2011). The regulation of sulfur metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*. 7, e1002036.
- Hell, R, Wirtz, M (2011). Molecular biology, biochemistry and cellular physiology of cysteine metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book*.
- Hochuli, E, Dobeli, H, Schacher, A (1987). New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighboring histidine residue. *Journal of Chromatography*. 411, 177-184.
- Hoffelder, M, Raasch, K, van Ooyen, J, Eggeling, L (2010). The E2 Domain of OdhA of *Corynebacterium glutamicum* has succinyltransferase activity dependent on lipoyl residues of the acetyltransferase AceF. *Journal of bacteriology*. 192, 5203-5211.
- Hoffmann, K, Grunberger, A, Lausberg, F, Bott, M, Eggeling, L (2013). Visualization of imbalances in sulfur assimilation and synthesis of sulfur-containing amino acids at the single-cell level. *Applied and environmental microbiology*. 79, 6730-6.
- Hoischen, C, Krämer, R (1990). Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology*. 172, 3409-3416.
- Holatko, J, Elisakova, V, Prouza, M, Sobotka, M, Nesvera, J, Patek, M (2009). Metabolic engineering of the L-valine biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum* using promoter activity modulation. *J Biotechnol*. 139, 203-10.
- Hwang, BJ, Kim, Y, Kim, HB, Hwang, HJ, Kim, JH, Lee, HS (1999). Analysis of *Corynebacterium glutamicum* methionine biosynthetic pathway: isolation and analysis of *metB* encoding cystathionine gamma-synthase. *Mol Cells*. 9, 300-8.
- Hwang, BJ, Yeom, HJ, Kim, Y, Lee, HS (2002). *Corynebacterium glutamicum* utilizes both transsulfuration and direct sulfhydrylation pathways for methionine biosynthesis. *Journal of Bacteriology*. 184, 1277-1286.
- Ikeda, M (2003). Amino Acid Production Processes. In: Faurie, R, Thommel, J, Bathe, B, Debabov, VG, Huebner, S, Ikeda, M, Kimura, E, Marx, A, Möckel, B, Mueller, U & Pfefferle, W (Eds.), Microbial Production of L-Amino Acids. Vol. 79. Springer Berlin Heidelberg, 1-35.
- Ikeda, M, Mizuno, Y, Awane, S, Hayashi, M, Mitsuhashi, S, Takeno, S (2011). Identification and application of a different glucose uptake system that functions as an alternative to the phosphotransferase system in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied microbiology and biotechnology*. 90, 1443-51.
- Ikeda, M, Nakagawa, S (2003). The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Applied microbiology and biotechnology*. 62, 99-109.
- Jäger, W, Schäfer, A, Pühler, A, Labes, G, Wohlleben, W (1992). Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium

- Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *Journal of Bacteriology*. 174, 5462-5465.
- Kai, Y, Kashiwagi, T, Ishikawa, K, Ziyatdinov, MK, Redkina, EI, Kiriukhin, MY, Gussyatiner, MM, Kobayashi, S, Takagi, H, Suzuki, E (2006). Engineering of *Escherichia coli* L-serine O-acetyltransferase on the basis of crystal structure: desensitization to feedback inhibition by L-cysteine. *Protein Engineering Design & Selection*. 19, 163-167.
- Kalinowski, J, Bathe, B, Bartels, D, Bischoff, N, Bott, M, Burkovski, A, Dusch, N, Eggeling, L, Eikmanns, BJ, Gaigalat, L, Goesmann, A, Hartmann, M, Huthmacher, K, Krämer, R, Linke, B, McHardy, AC, Meyer, F, Mockel, B, Pfefferle, W, Pühler, A, Rey, DA, Rückert, C, Rupp, O, Sahm, H, Wendisch, VF, Wiegrabe, I, Tauch, A (2003). The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *Journal of biotechnology*. 104, 5-25.
- Kaur, M, Bains, GS (1980). Effect of L-cysteine HCl and oxidants on the extensograms and structural relaxation in dough. *Food / Nahrung*. 24, 813-820.
- Keilhauer, C, Eggeling, L, Sahm, H (1993). Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum* - molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *Journal of Bacteriology*. 175, 5595-5603.
- Kim, JW, Kim, HJ, Kim, Y, Lee, MS, Lee, HS (2001). Properties of the *Corynebacterium glutamicum metC* gene encoding cystathionine beta-lyase. *Molecules and Cells*. 11, 220-225.
- Kind, S, Jeong, WK, Schröder, H, Zelder, O, Wittmann, C (2010). Identification and elimination of the competing N-acetyldiaminopentane pathway for improved production of diaminopentane by *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and environmental microbiology*. 76, 5175-80.
- Kinoshita, S, Uda, S, Shimono, M (1957). Studies on the amino acid fermentation. Part I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 3, 193-205.
- Kirchner, O, Tauch, A (2003). Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*. 104, 287-299.
- Klingenberg, M, Pfaff, E (1967). Means of terminating reactions. *Methods in Enzymology*. 10, 680-684.
- Koch, DJ, Rückert, C, Albersmeier, A, Huser, AT, Tauch, A, Pühler, A, Kalinowski, J (2005a). The transcriptional regulator SsuR activates expression of the *Corynebacterium glutamicum* sulphonate utilization genes in the absence of sulphate. *Molecular Microbiology*. 58, 480-494.
- Koch, DJ, Rückert, C, Rey, DA, Mix, A, Pühler, A, Kalinowski, J (2005b). Role of the *ssu* and *seu* genes of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 in utilization of sulfonates and sulfonate esters as sulfur sources. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 6104-6114.
- Kohl, TA, Tauch, A (2009). The GlxR regulon of the amino acid producer *Corynebacterium glutamicum*: Detection of the corynebacterial core regulon and integration into the transcriptional regulatory network model. *J Biotechnol*. 143, 239-46.
- Kopriva, S, Buchert, T, Fritz, G, Suter, M, Benda, RD, Schunemann, V, Koprivova, A, Schurmann, P, Trautwein, AX, Kroneck, PMH, Brunold, C (2002). The presence of an iron-sulfur cluster in adenosine 5'-phosphosulfate reductase separates organisms utilizing adenosine 5'-phosphosulfate and phosphoadenosine 5'-phosphosulfate for sulfate assimilation. *Journal of Biological Chemistry*. 277, 21786-21791.
- Kredich, NM (1996). Biosynthesis of cysteine. *Escherichia coli and Salmonella*. 514-527.
- Kredich, NM, Becker, MA, Tomkins, GM (1969). Purification and characterization of cyteine synthetase. A bifunctional protein complex from *Salmonella typhimurium*. *Journal of Biological Chemistry*. 244, 2428-8.

- Krömer, JO, Heinze, E, Schröder, H, Wittmann, C (2006). Accumulation of homolanthionine and activation of a novel pathway for isoleucine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* McbR deletion strains. *J Bacteriol.* 188, 609-18.
- Kumaran, S, Yi, H, Krishnan, HB, Jez, JM (2009). Assembly of the Cysteine Synthase Complex and the Regulatory Role of Protein-Protein Interactions. *Journal of Biological Chemistry.* 284, 10268-10275.
- Laemmli, UK (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
- Lausberg, F, Chattopadhyay, AR, Heyer, A, Eggeling, L, Freudl, R (2012). A tetracycline inducible expression vector for *Corynebacterium glutamicum* allowing tightly regulable gene expression. *Plasmid.* 68, 142-7.
- Ledl, F, Schleicher, E (1990). New aspects of the maillard reaction in foods and in the human body. *Angewandte Chemie International Edition in English.* 29, 565-594.
- Lee, HS (2005). Sulfur metabolism and its regulation. In: Eggeling, L & Bott, M (Eds.), *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. CRC Press, 351-376.
- Lewis, GP, McMartin, C, Yates, C (1970). An amino acid receptor in guinea-pig ileum. *British Journal of Pharmacology.* 39, 213-214.
- Link, AJ, Phillips, D, Church, GM (1997). Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: Application to open reading frame characterization. *Journal of Bacteriology.* 179, 6228-6237.
- Litsanov, B, Brocker, M, Bott, M (2012). Toward homosuccinate fermentation: metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for anaerobic production of succinate from glucose and formate. *Applied and Environmental Microbiology.* 78, 3325-3337.
- Maier, T, Winterhalter, C, Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Cystein oder L-Cystein-Derivaten. Deutschland, 2001.
- Marienhagen, J, Kennerknecht, N, Sahm, H, Eggeling, L (2005). Functional analysis of all aminotransferase proteins inferred from the genome sequence of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of bacteriology.* 187, 7639-46.
- Martin, JF, Barreiro, C, Gonzalez-Lavado, E, Barriuso, M (2003). Ribosomal RNA and ribosomal proteins in corynebacteria. *Journal of biotechnology.* 104, 41-53.
- McHardy, AC, Tauch, A, Rückert, C, Pühler, A, Kalinowski, J (2003). Genome-based analysis of biosynthetic aminotransferase genes of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology.* 104, 229-240.
- Mehaffy, C, Hess, A, Prenni, JE, Mathema, B, Kreiswirth, B, Dobos, KM (2010). Descriptive proteomic analysis shows protein variability between closely related clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics.* 10, 1966-84.
- Menkel, E, Thierbach, G, Eggeling, L, Sahm, H (1989). Influence of increased aspartate availability on lysine formation by a recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* and utilization of fumarate. *Applied and Environmental Microbiology.* 55, 684-688.
- Michener, JK, Thodey, K, Liang, JC, Smolke, CD (2012). Applications of genetically-encoded biosensors for the construction and control of biosynthetic pathways. *Metabolic Engineering.* 14, 212-222.
- Mino, K, Yamanoue, T, Sakiyama, T, Eisaki, N, Matsuyama, A, Nakanishi, K (1999). Purification and characterization of serine acetyltransferase from *Escherichia coli* partially truncated at the C-terminal region. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry.* 63, 168-179.
- Mizuno, T, Murao, K, Tanabe, Y, Oda, M, Tanaka, T (2007). Metal-ion-dependent GFP emission in vivo by combining a circularly permuted green fluorescent protein with an engineered metal-ion-binding coiled-coil. *J Am Chem Soc.* 129, 11378-83.
- Morbach, S, Kelle, R, Winkels, S, Sahm, H, Eggeling, L (1996). Engineering the homoserine dehydrogenase and threonine dehydratase control points to analyse flux towards L-

- isoleucine in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 45, 612-620.
- Morbach, S, Sahm, H, Eggeling, L (1995). Use of feedback-resistant threonine dehydratases of *Corynebacterium glutamicum* to increase carbon flux towards L-isoleucine. *Applied and environmental microbiology*. 61, 4315-4320.
- Mullis, KB, Faloona, FA (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*. 155, 335-350.
- Mustafi, N, Grünberger, A, Kohlheyer, D, Bott, M, Frunzke, J (2012). The development and application of a single-cell biosensor for the detection of L-methionine and branched-chain amino acids. *Metabolic engineering*. 14, 449-57.
- Nagai, T, Sawano, A, Park, ES, Miyawaki, A (2001). Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca²⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98, 3197-202.
- Nakamori, S, Kobayashi, SI, Kobayashi, C, Takagi, H (1998). Overproduction of L-cysteine and L-cystine by *Escherichia coli* strains with a genetically altered serine acetyltransferase. *Applied and Environmental Microbiology*. 64, 1607-1611.
- Nakatani, T, Ohtsu, I, Nonaka, G, Wiriyathanawudhiwong, N, Morigasaki, S, Takagi, H (2012). Enhancement of thioredoxin/glutaredoxin-mediated L-cysteine synthesis from S-sulfocysteine increases L-cysteine production in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*. 11.
- Netzer, R, Peters-Wendisch, P, Eggeling, L, Sahm, H (2004). Cometabolism of a nongrowth substrate: L-serine utilization by *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and environmental microbiology*. 70, 7148-55.
- Niebisch, A, Bott, M (2001). Molecular analysis of the cytochrome bc₁-aa₃ branch of the *Corynebacterium glutamicum* respiratory chain containing an unusual diheme cytochrome c₁. *Archives of microbiology*. 175, 282-94.
- Noji, M, Inoue, K, Kimura, N, Gouda, A, Saito, K (1998). Isoform-dependent differences in feedback regulation and subcellular localization of serine acetyltransferase involved in cysteine biosynthesis from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*. 273, 32739-32745.
- Okino, S, Suda, M, Fujikura, K, Inui, M, Yukawa, H (2008). Production of D-lactic acid by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Applied microbiology and biotechnology*. 78, 449-54.
- Olsen, LR, Huang, B, Vetting, MW, Roderick, SL (2004). Structure of serine acetyltransferase in complexes with CoA and its cysteine feedback inhibitor. *Biochemistry*. 43, 6013-9.
- Pappin, DJ, Hojrup, P, Bleasby, AJ (1993). Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Current biology : CB*. 3, 327-32.
- Park, S, Imlay, JA (2003). High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the fenton reaction. *J Bacteriol*. 185, 1942-50.
- Park, SD, Lee, JY, Kim, Y, Kim, JH, Lee, HS (1998). Isolation and analysis of *metA*, a methionine biosynthetic gene encoding homoserine acetyltransferase in *Corynebacterium glutamicum*. *Molecules and Cells*. 8, 286-294.
- Pascual, C, Lawson, PA, Farrow, JA, Gimenez, MN, Collins, MD (1995). Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *International journal of systematic bacteriology*. 45, 724-8.
- Perkins, DN, Pappin, DJ, Creasy, DM, Cottrell, JS (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 20, 3551-67.
- Peters-Wendisch, P, Netzer, R, Eggeling, L, Sahm, H (2002). 3-Phosphoglycerate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*: the C-terminal domain is not essential for activity but is required for inhibition by L-serine. *Applied microbiology and biotechnology*. 60, 437-41.

- Peters-Wendisch, P, Stolz, M, Etterich, H, Kennerknecht, N, Sahm, H, Eggeling, L (2005). Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-serine production. *Applied and environmental microbiology*. 71, 7139-44.
- Pinto, R, Tang, QX, Britton, WJ, Leyh, TS, Triccas, JA (2004). The *Mycobacterium tuberculosis* *cysD* and *cysNC* genes form a stress-induced operon that encodes a tri-functional sulfate-activating complex. *Microbiology*. 150, 1681-6.
- Pittman, MS, Corker, H, Wu, GH, Binet, MB, Moir, AJG, Poole, RK (2002). Cysteine is exported from the *Escherichia coli* cytoplasm by CydDC, an ATP-binding cassette-type transporter required for cytochrome assembly. *Journal of Biological Chemistry*. 277, 49841-49849.
- Pye, VE, Tingey, AP, Robson, RL, Moody, PCE (2004). The structure and mechanism of serine acetyltransferase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 279, 40729-40736.
- Quadroni, M, James, P, Dainese-Hatt, P, Kertesz, MA (1999). Proteome mapping, mass spectrometric sequencing and reverse transcription-PCR for characterization of the sulfate starvation-induced response in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Eur J Biochem*. 266, 986-96.
- Ramos, JL, Martinez-Bueno, M, Molina-Henares, AJ, Teran, W, Watanabe, K, Zhang, XD, Gallegos, MT, Brennan, R, Tobes, R (2005). The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 69, 326-330.
- Raux, E, Leech, HK, Beck, R, Schubert, HL, Santander, PJ, Roessner, CA, Scott, AI, Martens, JH, Jahn, D, Thermes, C, Rambach, A, Warren, MJ (2003). Identification and functional analysis of enzymes required for precorrin-2 dehydrogenation and metal ion insertion in the biosynthesis of sirohaem and cobalamin in *Bacillus megaterium*. *Biochem J*. 370, 505-16.
- Rey, DA, Nentwich, SS, Koch, DJ, Rückert, C, Pühler, A, Tauch, A, Kalinowski, J (2005). The McbR repressor modulated by the effector substance S-adenosylhomocysteine controls directly the transcription of a regulon involved in sulphur metabolism of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Molecular Microbiology*. 56, 871-887.
- Rey, DA, Pühler, A, Kalinowski, J (2003). The putative transcriptional repressor McbR, member of the TetR-family, is involved in the regulation of the metabolic network directing the synthesis of sulfur containing amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*. 103, 51-65.
- Rossol, I, Pühler, A (1992). The *Corynebacterium glutamicum aecD* gene encodes a C-S lyase with alpha, beta-elimination activity that degrades aminoethylcysteine. *J Bacteriol*. 174, 2968-77.
- Rückert, C, Kalinowski, J (2008). Sulfur metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. In: Burkovski, A (Ed.), *Corynebacteria: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, 217-239.
- Rückert, C, Koch, DJ, Rey, DA, Albersmeier, A, Mormann, S, Pühler, A, Kalinowski, J (2005). Functional genomics and expression analysis of the *Corynebacterium glutamicum fpr2-cysIXHDNYZ* gene cluster involved in assimilatory sulphate reduction. *Bmc Genomics*. 6.
- Rückert, C, Milse, J, Albersmeier, A, Koch, DJ, Pühler, A, Kalinowski, J (2008). The dual transcriptional regulator CysR in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 controls a subset of genes of the McbR regulon in response to the availability of sulphide acceptor molecules. *Bmc Genomics*. 9.
- Rückert, C, Pühler, A, Kalinowski, J (2003). Genome-wide analysis of the L-methionine biosynthetic pathway in *Corynebacterium glutamicum* by targeted gene deletion and homologous complementation. *Journal of Biotechnology*. 104, 213-228.
- Sambrook, J, Russell, DW (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. *Molecular cloning: A laboratory manual*.

- Sanger, F, Nicklen, S, Coulson, AR (1977). DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74, 5463-5467.
- Schäfer, A, Kalinowski, J, Simon, R, Seep-Feldhaus, AH, Pühler, A (1990). High-frequency conjugal plasmid transfer from gram-negative *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria. *Journal of bacteriology*. 172, 1663-6.
- Schäfer, A, Tauch, A, Droste, N, Pühler, A, Kalinowski, J (1997). The *Corynebacterium glutamicum* *cglIM* gene encoding a 5-cytosine methyltransferase enzyme confers a specific DNA methylation pattern in an McrBC-deficient *Escherichia coli* strain. *Gene*. 203, 95-101.
- Schäfer, A, Tauch, A, Jäger, W, Kalinowski, J, Thierbach, G, Pühler, A (1994). Small mobilizable multipurpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19 - selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*. 145, 69-73.
- Schaffer, S, Weil, B, Nguyen, VD, Dongmann, G, Gunther, K, Nickolaus, M, Hermann, T, Bott, M (2001). A high-resolution reference map for cytoplasmic and membrane-associated proteins of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis*. 22, 4404-22.
- Schneider, J, Wendisch, VF (2010). Putrescine production by engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Applied microbiology and biotechnology*. 88, 859-68.
- Schröder, J, Tauch, A (2010). Transcriptional regulation of gene expression in *Corynebacterium glutamicum*: the role of global, master and local regulators in the modular and hierarchical gene regulatory network. *FEMS Microbiol Rev*. 34, 685-737.
- Smith, KM, Cho, KM, Liao, JC (2010). Engineering *Corynebacterium glutamicum* for isobutanol production. *Applied microbiology and biotechnology*. 87, 1045-55.
- Sorensen, MA, Pedersen, S (1991). Cysteine, even in low concentrations, induces transient amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 173, 5244-5246.
- Spencer, JB, Stelowich, NJ, Roessner, CA, Scott, AI (1993). The *Escherichia coli* *cysG* gene encodes the multifunctional protein, siroheme synthase. *FEBS Lett*. 335, 57-60.
- Stackebrandt, E, Rainey, FA, Ward-Rainey, NL (1997). Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actinobacteria classis nov. *International journal of systematic bacteriology*. 47, 479-491.
- Stolz, M, Peters-Wendisch, P, Etterich, H, Gerharz, T, Faurie, R, Sahm, H, Fersterra, H, Eggeling, L (2007). Reduced folate supply as a key to enhanced L-serine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and environmental microbiology*. 73, 750-5.
- Suda, M, Teramoto, H, Imamiya, T, Inui, M, Yukawa, H (2008). Transcriptional regulation of *Corynebacterium glutamicum* methionine biosynthesis genes in response to methionine supplementation under oxygen deprivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 81, 505-513.
- Takagi, H, Awano, N, Kobayashi, S, Noji, M, Saito, K, Nakamori, S (1999). Overproduction of L-cysteine and L-cystine by expression of genes for feedback inhibition-insensitive serine acetyltransferase from *Arabidopsis thaliana* in *Escherichia coli*. *Fems Microbiology Letters*. 179, 453-459.
- Tauch, A, Homann, I, Mormann, S, Ruberg, S, Billault, A, Bathe, B, Brand, S, Brockmann-Gretza, O, Rückert, C, Schischka, N, Wrenger, C, Hoheisel, J, Mockel, B, Huthmacher, K, Pfefferle, W, Pühler, A, Kalinowski, J (2002a). Strategy to sequence the genome of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: use of a cosmid and a bacterial artificial chromosome library. *Journal of biotechnology*. 95, 25-38.
- Tauch, A, Kirchner, O, Löffler, B, Gotker, S, Pühler, A, Kalinowski, J (2002b). Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1. *Current Microbiology*. 45, 362-367.

- Tralau, T, Vuilleumier, S, Thibault, C, Campbell, BJ, Hart, CA, Kertesz, MA (2007). Transcriptomic analysis of the sulfate starvation response of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 189, 6743-50.
- Umbarger, HE (1978). Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annual Review of Biochemistry.* 47, 533-606.
- van der Meer, JR, Belkin, S (2010). Where microbiology meets microengineering: design and applications of reporter bacteria. *Nature Reviews Microbiology.* 8, 511-522.
- van Rossum, T, Kengen, SW, van der Oost, J (2013). Reporter-based screening and selection of enzymes. *The FEBS journal.* 280, 2979-96.
- Vertès, AA, Inui, M, Yukawa, H (2013). The biotechnological potential of *Corynebacterium glutamicum*, from *Umami* to *Chemurgy*. In: Yukawa, H & Inui, M (Eds.), *Corynebacterium glutamicum: Biology and Biotechnology*. Vol. 23. Springer Berlin Heidelberg, 1-49.
- Wada, M, Awano, N, Haisa, K, Takagi, H, Nakamori, S (2002). Purification, characterization and identification of cysteine desulfhydrase of *Corynebacterium glutamicum*, and its relationship to cysteine production. *Fems Microbiology Letters.* 217, 103-107.
- Wada, M, Awano, N, Yamazawa, H, Takagi, H, Nakamori, S (2004). Purification and characterization of O-acetylserine sulfhydrylase of *Corynebacterium glutamicum*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry.* 68, 1581-1583.
- Wada, M, Takagi, H (2006). Metabolic pathways and biotechnological production of L-cysteine. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 73, 48-54.
- Wang, F, Niu, W, Guo, J, Schultz, PG (2012). Unnatural amino acid mutagenesis of fluorescent proteins. *Angew Chem Int Ed Engl.* 51, 10132-5.
- Wichter, J (2011). Untersuchung der L-Cystein-Biosynthese in *Escherichia coli* mit Techniken der Metabolom- und 13C-Stoffflussanalyse. Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Williams, SJ, Senaratne, RH, Mougous, JD, Riley, LW, Bertozzi, CR (2002). 5'-adenosinephosphosulfate lies at a metabolic branch point in mycobacteria. *Journal of Biological Chemistry.* 277, 32606-32615.
- Wirtz, M, Droux, M, Hell, R (2004). O-acetylserine (thiol) lyase: an enigmatic enzyme of plant cysteine biosynthesis revisited in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany.* 55, 1785-1798.
- Wirtz, M, Hell, R (2003). Production of cysteine for bacterial and plant biotechnology: Application of cysteine feedback-insensitive isoforms of serine acetyltransferase. *Amino Acids.* 24, 195-203.
- Wirtz, M, Hell, R (2006). Functional analysis of the cysteine synthase protein complex from plants: Structural, biochemical and regulatory properties. *Journal of Plant Physiology.* 163, 273-286.
- Yamada, S, Awano, N, Inubushi, K, Maeda, E, Nakamori, S, Nishino, K, Yamaguchi, A, Takagi, H (2006). Effect of drug transporter genes on cysteine export and overproduction in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology.* 72, 4735-4742.
- Young, TS, Ahmad, I, Yin, JA, Schultz, PG (2010). An enhanced system for unnatural amino acid mutagenesis in *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 395, 361-74.
- Zhao, CH, Moriga, Y, Feng, B, Kumada, Y, Imanaka, H, Imamura, K, Nakanishi, K (2006). On the interaction site of serine acetyltransferase in the cysteine synthase complex from *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 341, 911-916.
- Ziment, I (1988). Acetylcysteine - a drug that is much more than a mucokinetic. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 42, 513-519.
- Zittrich, S, Krämer, R (1994). Quantitative discrimination of carrier-mediated excretion of isoleucine from uptake and diffusion in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology.* 176, 6892-6899.

Zuber, B, Chami, M, Houssin, C, Dubochet, J, Griffiths, G, Daffe, M (2008). Direct visualization of the outer membrane of *mycobacteria* and *corynebacteria* in their native state. *Journal of bacteriology*. 190, 5672-5680.

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Bott danke ich für die Übernahme des Hauptreferates, dem Interesse am Fortgang dieser Arbeit und der Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. Jäger danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Ganz besonders danke ich Herrn Dr. Eggeling für die stete Diskussionsbereitschaft, das immerwährende Interesse an der Arbeit und die Unterstützung über die gesamten drei Jahre.

Dem Graduiertencluster „CLIB-GC“ danke ich für das Stipendium und die Unterstützung von Seiten der Verantwortlichen.

Ich danke allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der AG Eggeling/ AG Marienhagen, bestehend aus Karin, Sascha, Norma, Stephan, Georg, Martin, Sabine, Paul, Felix, Jenny, Marcus, Michi sowie den beiden Jans für die schöne Zeit, die beständige Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Atmosphäre im Labor.

Ganz besonders herzlich danke ich Janine, Nina, Katharina, Sabrina, Philana, Heike und Dan, die meine Zeit am Forschungszentrum bereichert haben, für gute Ratschläge und die über die Zeit zu guten Freunden geworden sind.

Weiterhin danke ich der tollen Mitfahrgelegenheit Aachen für die schöne Zeit innerhalb und außerhalb des Autos und dafür, dass die Pendelzeit immer sehr kurzweilig war.

Ich danke auch allen anderen Mitgliedern des IBT-1 und der Infrastruktur für die wunderbare Atmosphäre.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Freunden Ava, Lisa und Stephie, dafür dass sie unsere „Telefonfreundschaften“ über die weiten Distanzen überstanden haben.

Ganz besonders danke ich meiner Freundin Kristina dafür, dass sie während der ganzen Zeit für mich da war, mich unterstützt hat und sich immer geduldig meine Probleme angehört hat und für die „Ideen, Rat und Lebenshilfe“. Wir sind ein großes Stück unseres Lebens zusammen gegangen und miteinander gewachsen.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Oma, danke ich dafür, dass ich immer willkommen bin, sie immer für mich da waren, dass ich bei ihnen so sein kann, wie ich bin, und für die bedingungslose Liebe und grenzenlose Unterstützung.

Band / Volume 55

**Development of Surface-FIDA towards a diagnostic tool
for Alzheimer's disease**

L. Wang-Dietrich (2012), VI, 103 pp

ISBN: 978-3-89336-801-3

Band / Volume 56

**Untersuchungen zur sekretorischen Proteingewinnung industriell
relevanter Enzyme mit *Corynebacterium glutamicum***

S. Scheele (2012), vii, 127 pp

ISBN: 978-3-89336-815-0

Band / Volume 57

**Novel insights into the energy metabolism of
Corynebacterium glutamicum by comprehensive analysis
of mutants defective in respiration or oxidative phosphorylation**

A. Koch-Körfges (2012), III, 137 pp

ISBN: 978-3-89336-826-6

Band / Volume 58

**Prozessnahe Hochdurchsatzoptimierung der heterologen
Proteinproduktion in alternativen Wirtsorganismen**

P. Rohe (2012), 165 pp

ISBN: 978-3-89336-834-1

Band / Volume 59

**Validation and characterisation of novel cellular ligands
of membrane-associated HIV-1 Nef**

E.C.Kammula (2012), 151 pp

ISBN: 978-3-89336-839-6

Band / Volume 60

**Untersuchungen zur Membranintegrität während der
Tat-abhängigen Proteintranslokation in *Escherichia coli***

S. Fleckenstein (2013), VI, 160 pp

ISBN: 978-3-89336-841-9

Band / Volume 61

Characterization of Novel Amyloid- β Peptide (A β) Binding Ligands

S. Dornieden (2013), vii, 129 pp

ISBN: 978-3-89336-844-0

Band / Volume 62

**Regulatorische Aspekte der Expression und Sekretion
heterologer Proteine in *Corynebacterium glutamicum***

A. R. Chattopadhyay (2013), VIII, 195 pp

ISBN: 978-3-89336-845-7

Band / Volume 63

***Gluconobacter oxydans* strain development:
Studies on central carbon metabolism and respiration**

J. Richhardt (2013), III, 181 pp

ISBN: 978-3-89336-851-8

Band / Volume 64

**Metabolic Engineering von *Corynebacterium glutamicum*
für die Produktion einer Dicarbonsäure**

A. Otten (2013), 98 pp

ISBN: 978-3-89336-860-0

Band / Volume 65

**Rapid Development of Small-Molecule producing Microorganisms
based on Metabolite Sensors**

S. Binder (2013), 138 pp

ISBN: 978-3-89336-872-3

Band / Volume 66

**Increasing the NADPH supply for whole-cell biotransformation
and development of a novel biosensor**

S. Solvej (2013), 130 pp

ISBN: 978-3-89336-900-3

Band / Volume 67

**Expression, purification and biophysical characterization
of human Presenilin 2**

G. Yang (2013), 159 pp

ISBN: 978-3-89336-928-7

Band / Volume 68

**Modifikationen der Atmungskette in *Corynebacterium glutamicum*
und Rolle des Flavohämoproteins Hmp**

L. Platzen (2013), IV, 119 pp

ISBN: 978-3-89336-931-7

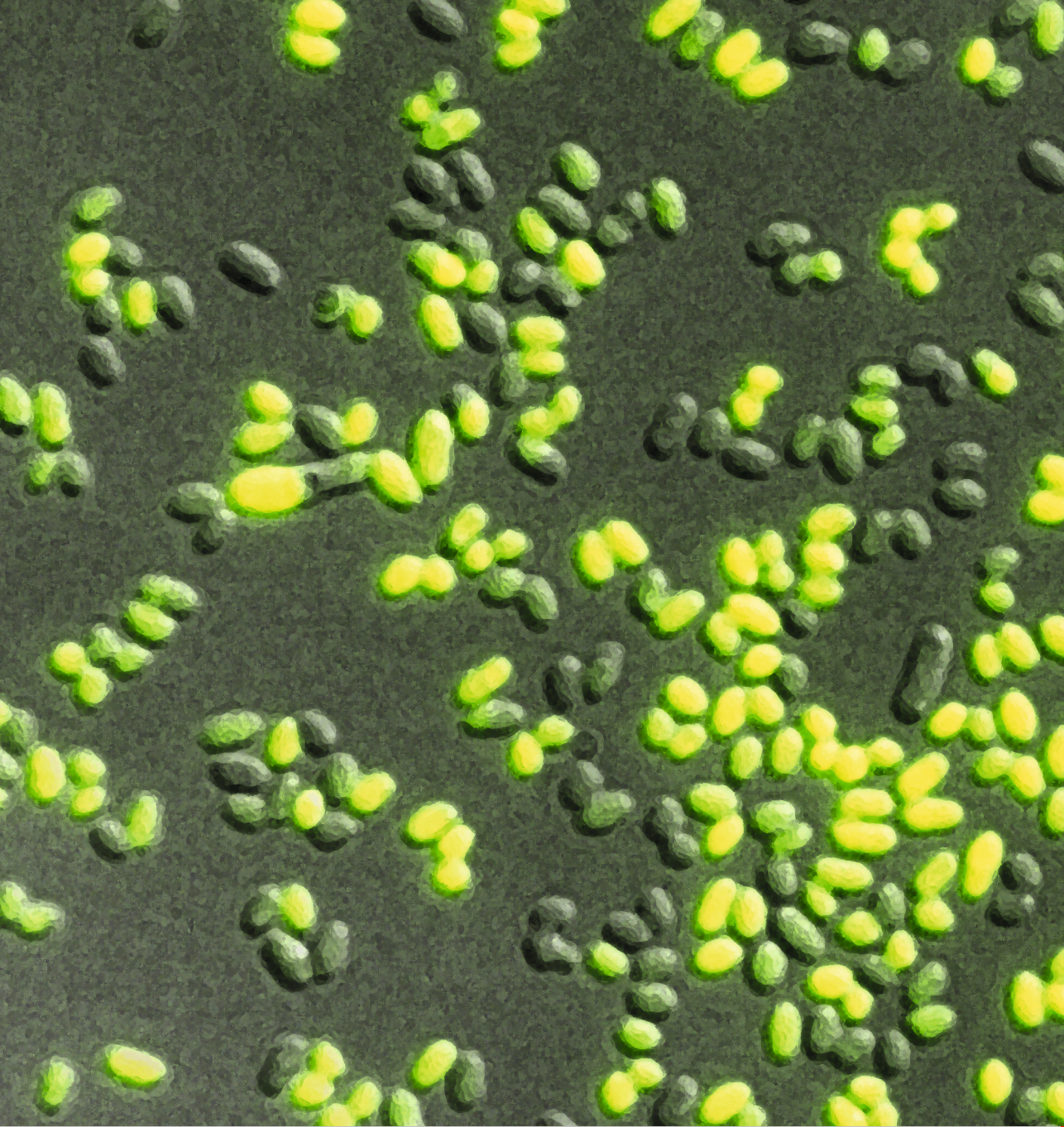
Band / Volume 69

**L-Cystein-Bildung mit *Corynebacterium glutamicum* und
optische Sensoren zur zellulären Metabolitanalyse**

K. Hoffmann (2014),vi, 81 pp

ISBN: 978-3-89336-939-3

Weitere **Schriften des Verlags im Forschungszentrum Jülich** unter
<http://wwwzb1.fz-juelich.de/verlagextern1/index.asp>



Gesundheit / Health
Band / Volume 69
ISBN 978-3-89336-939-3

